SYNTHESEN VON THYMOSIN β_9 (1–7) UNTER VERWENDUNG KONVENTIONELLER SCHUTZGRUPPEN UND DER NEU ENTWICKELTEN t–BUMEOC–GRUPPE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Jürgen Müller

aus Schwäbisch Gmünd

1984

UNIV.
LEEDS
LIBR.

SYNTHESEN VON THYMOSIN β_9 (1–7) UNTER VERWENDUNG KONVENTIONELLER SCHUTZGRUPPEN UND DER NEU ENTWICKELTEN t–BUMEOC–GRUPPE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Jürgen Müller

aus Schwäbisch Gmünd

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 1984

Dekan: Professor Dr. Joachim Strähle

1. Berichterstatter: Professor Dr. Wolfgang Voelter

2. Berichterstatter: Professor Dr. Ernst Bayer

Für Isabella und Tavi

A b s t r a c t

Jürgen Müller

Synthesen von Thymosin β_9 (1-7)
unter Verwendung konventioneller Schutzgruppen
und der neu entwickelten t-Bumeoc-Gruppe

Verschiedene klassische Synthesen von Thymosin β_9 (1-7) werden beschrieben. Die Sequenz wird einmal mit geschütztem und einmal mit freiem Carboxylende synthetisiert. Nach schrittweiser Kupplung zum Fragment 4-7 H-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe(OH) wird dieses mit Fragment 2-3 (Z-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OH) verknüpft. Nach Entacylierung wird mit Acetylalanin zum Heptapeptid verlängert.

Da die Entfernung der Aminoschutzgruppe des Hexapeptids nicht eindeutig verläuft, wird hier die neue, extrem säurelabile 1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl-(t-Bumeoc)-Gruppe eingesetzt. Ihr Abspaltungsverhalten in drei verschiedenen Systemen wird untersucht und die Geschwindigkeitskonstanten verschiedener t-Bumeoc-Derivate mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Dünnschichtchromatographie bestimmt. Die Deblockierung vom Hexapeptidmethylester bei Anwesenheit von drei sauer abspaltbaren Schutzgruppen gelingt selektiv und innerhalb von Sekunden. Die t-Bumeoc-Gruppe zeigt starke lösungsvermittelnde Eigenschaften und ist unter den üblichen Kupplungsbedingungen stabil. Die Abspaltung der Schutzgruppen gelingt mit konzentrierter Trifluoressigsäure. Falls notwendig, wird vorher mit 1N NaOH verseift.

Das freie Peptid wird auf seine biologische Aktivität in Zellkulturen (Proliferation von humanen Tumorzellen und diploiden Fibroblasten) und am Tier (Meth.A.-Tumor in Mäusen) untersucht.

UNIV. LÜBECK BIBL.

Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterbrechungen in der Zeit von Januar 1981 bis Februar 1984 an der Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität Tübingen unter wissenschaflicher Anleitung von Professor Dr. W. Voelter angefertigt.

Herrn Professor Dr. W. Voelter
danke ich herzlich für die Themenstellung, sein stetes Interesse und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Dem Verband der chemischen Industrie, Stiftung Stipendien-Fond, sei für die Verleihung eines Promotionsstipendiums herzlich gedankt.

Folgenden Damen und Herren bin ich zu Dank verpflichtet:

Für die Aufnahme zahlreicher Spektren möchte ich Herrn Bartholomä (FD-MS) und Herrn Maier (^{13}C-NMR-Spektren) danken. Frau Munari und Herrn Dr. Stock sei für die Anfertigung der Aminosäurenanalysen, Frau Bauer für die sorgfältige Durchführung der Elementaranalysen gedankt. Frau Alice Wilczek danke ich für die Ausführung präparativer Arbeiten im Labor und Herrn Harald Wucherer danke ich für die Anfertigung der Racemattests und der Hilfe bei den kinetischen Untersuchungen.
Mein besonderer Dank gilt Frau Ute Töpfer für die Anfertigung zahlreicher Zeichnungen und Frau Erna Hagemann für die Anfertigung des Manuskripts.
Herrn Prof. Munder und Herrn Dr. Stiefel sei für die biologischen Aktivitätsuntersuchungen gedankt.

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

AAK	Autoantikörper
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
Bu^t	tert.-Butyl
t-Bumeoc	1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methyl-ethoxycarbonyl
c-AMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
c-GMP	cyclo-Guanosinmonophosphat
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
DCHA	Dicyclohexylammonium
DMF	Dimethylformamid
EE	Essigsäureethylester
ELISA	Enzymelinked Immunosorbent Assay
FD-MS	Felddesorptions-Massenspektrometrie
FTS	Facteur Thymic Serique
GvH	Graft versus Host
HAc	Essigsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	N-Hydroxysuccinimid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IP	Isoelektrischer Punkt
MeOH	Methanol
MLC	Mixed-Lymphocyte-Culture
PID	Primärer Immundefekt
SF	Serumfaktor
SID	Sekundärer Immundefekt
SLE	Systemic Lupus Erythematodes
TdT	terminale Desoxynucleotidyltransferase
TFA	Trifluoressigsäure
TF 5	Thymosin-Fraktion 5
THF	Humoraler Thymusfaktor
Z	Benzyloxycarbonyl

Die Abkürzungen für Aminosäuren entsprechen denen der IUPAC-IUB-Nomenklatur-Kommission: Eur. J. Biochm. 27, 201 (1972); 74, 1 (1977).

Inhaltsverzeichnis

		Seite:
I.	EINLEITUNG	1
II.	ALLGEMEINER TEIL	1
1.	Der Thymus	1
2.	Das Immunsystem	3
3.	Immunkrankheiten	6
4.	Thymuspeptide	8
4.1.	Thymosin Fraktion 5 (TF 5)	9
4.2.	Thymosin α_1	9
4.3.	Thymosin α_7	10
4.4.	Thymosin β_1	10
4.5.	Thymosin β_3	10
4.6.	Thymosin β_4	11
4.7.	Thymosin β_8 und Thymosin β_9	11
4.8.	Thymosin β_{10}	11
4.9.	Facteur Thymique Serique (FTS)	12
4.10.	Humoraler Thymus Faktor (THF)	13
4.11.	Serum Faktor (SF)	13
4.12.	Thymon A, Thymon B, Thymon C	14
4.13.	Thymopoietin I, II und III (TP I, TP II, TP III)	14
4.14.	Thymic Polypeptide A	15
III.	THEMENSTELLUNG	15
IV.	SPEZIELLER TEIL	17
1.	Überlegungen zur Synthese	17
2.	Synthese des Thymosin β_9 (1-7)	19
2.1.	Syntheseweg 1	19
2.2.	Abspaltung der Schutzgruppen und Reinigung von Thymosin β_9	30
2.3.	Syntheseweg 2	31
2.4.	Syntheseweg 3	41
2.4.1.	Konzept der differenzierten Säurehydrolyse	41
2.4.2.	Überlegungen zur Synthese säurelabiler Schutzgruppen	41
2.4.3.	Die 1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methyl-ethoxycarbonyl(t-Bumeoc)-Gruppe	42
2.4.4.	Synthese der Ausgangsverbindungen und Einführungsreagenzien	44

		Seite:
2.4.5.	Darstellung von t-Bumeoc-Aminosäuren	46
2.4.6.	^{13}C-NMR-Spektroskopie der t-Bumeoc-Aminosäuren	46
2.4.7.	Bestimmung der Abspaltungsgeschwindigkeit	49
2.4.8.	Synthese des Thymosin β_9 (1-7) unter Verwendung der t-Bumeoc-Gruppe	55
2.5.	Biologische Aktivitätsuntersuchungen	61
V.	EXPERIMENTELLER TEIL	63
1.	Spektroskopische Methoden	63
1.1.	Kernresonanzspektroskopie	63
1.2.	Massenspektrometrie	63
1.3.	Drehwerte	63
2.	Chromatographische Methoden	64
3.	Sonstige Geräte	65
4.	Chemikalien	65
5.	Synthese des Thymosin β_9 (1-7) nach Syntheseweg 1 (Ac-L-Ala-L-Asp-L-Lys-L-Pro-L-Asp-L-Leu-Gly-OH)	67
5.1.	Glycinmethylester.Hydrochlorid (H-Gly-OMe.HCl)	67
5.2.	N-Benzyloxycarbonyl-L-Leucin (Z-L-Leu-OH)	67
5.3.	N-Benzyloxycarbonyl-L-leucyl-glycinmethylester (Z-L-Leu-Gly-OMe)	67
5.4.	L-Leucyl-glycinmethylester.Hydrochlorid (H-L-Leu-Gly-OMe.HCl)	68
5.5.	N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-ß-tert.-butylester (Z-L-Asp(OBu^t)-OH)	69
5.5.1.	N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure (Z-L-Asp-OH)	69
5.5.2.	N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäureanhydrid (Z-L-Asp-O)	69
5.5.3.	N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-α-p-nitrobenzylester (Z-L-Asp-α-ONb)	70
5.5.4.	N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure(ß-tert.-butylester)-α-p-nitrobenzylester (Z-L-Asp-(OBu^t)-ONb)	70
5.5.5.	N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure(ß-tert.-butylester)-α-dicyclohexylammoniumsalz (Z-L-Asp(OBu^t)-OH.DCHA)	71
5.6.	N-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-Leucyl-glycinmethylester (Z-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe)	71

Seite:

5.7. L-Asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester.Hydrochlorid (H-L-Asp-(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe.HCl) 72

5.8. N-Benzyloxycarbonyl-L-prolin (Z-L-Pro-OH) 73

5.9. N-Benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (Z-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe) 73

5.10. L-Prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (H-L-Pro-L-Asp-(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe) 74

5.11. N^{ε}-tert.-Butyloxycarbonyl-L-Lysin (H-L-Lys-(Boc)-OH) 74

5.11.1. N^{ε}-Benzyliden-L-Lysin (H-L-Lys(Bal)-OH 74

5.11.2. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin (Z-L-Lys-OH) 75

5.11.3. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin.Dicyclohexylammoniumsalz (Z-L-Lys(Boc)-OH.DCHA) 76

5.11.4. N^{ε}-tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysin (H-L-Lys(Boc)-OH) 76

5.12. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure(ß-tert.-butylester)-N-hydroxysuccinimidester (Z-L-Asp(OBu^t)-OSu) 77

5.13. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin.Dicyclorhexylammoniumsalz (Z-L-Asp-(OBu^t)-L-Lys(Boc)-OH.DCHA) 78

5.14. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (Z-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe) 78

5.15. L-Asparagyl-(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl (ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (H-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe) 79

5.16. N-Acetyl-L-alanin (Ac-L-Ala-OH) 80

5.17. N-Acetyl-L-alanin-N-hydroxysuccinimidester (Ac-L-Ala-OSu) 81

5.18. N-Acetyl-L-alanyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (Ac-L-Ala-L-Asp-OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe) 81

5.19. N-Acetyl-L-alanyl-L-asparagyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl-L-leucyl-glycin (Thymosin $ß_9$ (1-7) (Ac-L-Ala-L-Asp-L-Lys-L-Pro-L-Asp-L-Leu-Gly-OH) 83

Seite:

6. Synthese des Thymosin β_9 (1-7) nach Syntheseweg 2 (Ac-L-Ala-L-Asp-L-Lys-L-Pro-L-Asp-L-Leu-Gly-OH) 84

6.1. N-Benzyloxycarbonyl-L-leucyl-glycin (Z-L-Leu-Gly-OH) 84

6.2. L-Leucyl-glycin.Hydrochlorid (H-L-Leu-Gly-OH.HCl) 85

6.3. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycin (Z-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH) 85

6.4. L-Asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycin (H-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH) 86

6.5. N-Benzyloxycarbonyl-L-prolin-N-hydroxysuccinimidester (Z-L-Pro-OSu) 86

6.6. N-Benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-asparagyl-(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycin (Z-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH) 87

6.7. L-Prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycin (H-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH) 88

6.8. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl-(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin-N-hydroxysuccinimidester (Z-L-Asp-(OBu^t)-L-Lys(Boc)-OSu) 88

6.9. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycin (Z-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH) 89

6.10. N-Acetyl-L-alanyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asaparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycin (Ac-L-Ala-L-Asp(OBu^t)-L-Lys-(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH) 90

7. Synthese des Thymosin β_9 (1-17) unter Verwendung der t-Bumeoc-Gruppe 91

7.1. Herstellung von 1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl-Aminosäuren

7.1.1. 3,5-Di-tert.-butylbenzoesäure 91

7.1.2. 3,5-Di-tert.-butylbenzoesäuremethylester 91

7.1.3. 2-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-2-propanol 92

7.1.4. Fluorameisensäure-[1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methylethyl]ester (t-Bumeoc-F) 93

7.1.5. Darstellung der t-Bumeoc-Aminosäuren (Allgemeine Arbeitsvorschrift) 93

Seite:

7.2. Darstellung des Thymosin β_9 (1-7) 94

7.2.1. L-Asparaginsäure(ß-tert.-butylester) (H-L-Asp(OBu^t)-OH) 94

7.2.2. N-[1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methyl-ethoxycarbonyl]-L-asparagyl(ß-tert.-butyl-ester)-N-hydroxysuccinimidester (t-Bumeoc-L-Asp(OBu^t)-OSu) 94

7.2.3. N-[1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methyl-ethoxycarbonyl]-L-asparagyl(ß-tert.-butyl-ester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin. Dicyclohexylammoniumsalz (t-Bumeoc-L-Asp-(OBu^t)-L-Lys(Boc)-OH.DCHA) 95

7.2.4. N-[1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methyl-ethoxycarbonyl]-L-asparagyl(ß-tert.-butyl-ester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (t-Bumeoc-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe) 96

7.2.5. L-Asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (H-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe) 97

7.2.6. Acetyl-L-alanyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (Ac-L-Ala-L-Asp-OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe) 97

7.2.7 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung der Abspaltungskinetik 98

VI. ZUSAMMENFASSUNG 100

VII. LITERATURVERZEICHNIS 102

I. EINLEITUNG

Experimentelle und klinische Studien zeigen, daß eine Störung des Thymus oder des thymusabhängigen Immunsystems zu Immunmangelkrankheiten, Neigung zu Autoimmunkrankheiten, erhöhter Anfälligkeit gegen Infektionen und zu einem erhöhten Krebsrisiko führen kann. Heute zählt man den Thymus zu den primären lymphatischen Organen und zu den endokrinen Drüsen. Vom Thymus ausgeschiedene Hormone beeinflussen die Reifung von sogenannten Vorläuferzellen zu immunkompetenten T-Lymphocyten[1]. Bei teilweiser oder völliger Fehlfunktion des Thymus könnte nun durch die Gabe bestimmter Thymushormone wieder die volle Aktivität des thymusabhängigen Immunsystems erreicht werden. Die erste und teilweise gereinigte Peptidfraktion aus Kalbsthymus, genannt Thymosin, zeigt sowohl in vivo als auch in vitro biologische Aktivität[2]. Deshalb ist die Isolierung, Sequenzierung, Synthese, biologische Aktivität und Wirkung von weiteren Thymuspetiden von großem Interesse, da die genauen Zusammenhänge zwischen Thymus und thymusabhängiger zellulärer Immunantwort bis heute noch unvollkommen erforscht sind.

II. ALLGEMEINER TEIL

II.1. Der Thymus

Der Thymus ist ein zweilappiges lymphoepitheliales Organ, welches im vorderen Mediastinum liegt und sich am Ende des 1. Embryonalmonats aus dem Epithel (Entoderm) der 3. und 4. Schlundtasche entwickelt. Die Drüse wächst bis zur Geschlechtsreife, um sich dann langsam zurückzubilden. Sie ist in Läppchen gegliedert, die durch einen zentralen Markstrang zusammengehalten werden. Jedes Läppchen läßt eine Rinden- und Markzone unterscheiden. Das Grundgerüst bildet ein epitheliales Netz aus miteinander in Verbindung ste-

henden Zellen, die sich an der Läppchenoberfläche epithelartig zusammenschließen. Die von ihnen gebildeten zwiebelschalenartigen Zellkugeln werden Hassal-Körperchen genannt.

Bis vor ungefähr 20 Jahren wurde der Thymus als Überbleibsel der Evolution ohne eigentliche Funktion im Organismus angesehen. Erst 1961 konnte durch die Arbeiten von verschiedenen Gruppen gezeigt werden, daß dem Thymus eine wichtige Bedeutung bei der Entwicklung und Erhaltung des Immunsystems zukommt[3-17]. Entfernt man den Thymus bei neugeborenen, immunologisch unreifen Mäusen, so kann man im Laufe der Zeit folgende Erscheinungen beobachten: Gewichtsabnahme, Kümmerwuchs, hohe Infektionsanfälligkeit, Involution von Milz und Lymphknoten, verminderte Zahl an im Blut zirkulierenden Lymphocyten, die Unfähigkeit Transplantate abzustoßen und frühzeitigen Tod (sog. Wasting-Syndrom).

Erwachsene Mäuse zeigen diese Symptome nicht. Setzt man sie jedoch einer Ganzkörperbestrahlung aus, so wird deutlich, daß der Thymus eine wichtige Rolle bei der Wiederherstellung der Immunität nach einer massiven Störung des Immunsystems spielt[18,19].

Die Symptome bei neonatal thymektomierten Mäusen können durch Verpflanzung von Thymusgewebe und durch Gabe von Lymphocyten aus Lymphknoten und Milz verhindert werden. Auch die Verpflanzung von Thymusgewebe in Diffusionskammern führt zu einer Wiederherstellung der Immunantwort. Bei bestrahlten Mäusen führt aber nur eine gleichzeitige Gabe von Thymus- und Knochenmarkszellen wieder zu einer positiven Immunreaktion. Gibt man neonatal thymektomierten Mäusen bzw. erwachsenen thymektomierten Mäusen nach Ganzkörperbestrahlung wiederholte Injektionen von Thymusextrakten, so kann man mit Hilfe des GvH-Testes eine Wiederherstellung der Immunantwort beobachten[20-31]. Die Versuche in dieser Richtung zeigen eindeutig, daß ein humoraler Faktor bei der Reifung und Differenzierung immunkompetenter Zellen aus vom Knochenmark stammenden Vorläuferzellen mitwirkt.

Versuche bei Vögeln deuten darauf hin, daß sich das Immunsystem in zwei funktionelle Grundtypen einteilen läßt. Bei neonatal thymektomierten Küken geht die zelluläre Immunität verloren, während die Fähigkeit zur Antikörperbildung erhalten bleibt. Dagegen verlieren bursektomierte Küken ihre humorale Immunität. Die zelluläre Immunität, z.B. die Fähigkeit Transplantate abzustoßen, bleibt dafür intakt. Die klare anatomische Zuordnung, speziell für das Bursaäquivalent, konnte beim Säugetier bis heute noch nicht eindeutig bestimmt werden. Möglicherweise handelt es sich um das lymphatische Gewebe im Darmtrakt (z.B. Appendix, Peyer's Plaques)[13,32-35].

II.2. Das Immunsystem

Höhere Organismen besitzen die Fähigkeit zwischen körpereigenen und körperfremden Substanzen zu unterscheiden. Die Abwehr von Fremdkörpern teilt sich dabei in ein unspezifisches und ein spezifisches System. Das Erstere stellt die alleinige Abwehr bei Wirbellosen dar und ist als Sofortabwehr gegenüber einem weiten Spektrum von Mikroorganismen wirksam. Sowohl die Mikrophagen (eosinophile und neutrophile Granulocyten), als die Makrophagen phagozytieren eingedrungene Fremdkörper. Die Makrophagen erledigen die Hauptaufgabe bei der Aufnahme und dem Abbau von Antigenen. Die Wechselwirkungen mit dem spezifischen Abwehrsystem beziehen sich auf die Präsentation des Antigens für immunkompetente T-Lymphocyten, den Transport von Antigenen in die sekundären lymphatischen Organe und die Vermittlung bei der B-T-Lymphocytenkooperation zur Antikörpersynthese. Unter dem Einfluß von Lymphokinen aus bestimmten T-Zellen werden Makrophagen aktiviert und gezielt in das spezifische Abwehrgeschehen mit einbezogen[36-49].

Gelingt es Mikroorganismen oder toxischen Substanzen den unspezifischen Schutz zu durchbrechen, werden sie vom spezifischen Immunabwehrsystem unschädlich gemacht. Das entsprechende Antigen bewirkt eine gerichtete und spezifische Abwehrreaktion auf humoraler und zellulärer Ebene. Das T-Zellsystem vermittelt die Transplantations- und Tumorimmunität, sowie die Abwehr gegen Viren, Mycobakterien, Pilze und Protozoen. Das B-Zellsystem vermittelt durch die Antikörperproduktion die Immunität gegen Bakterien und Viren. Der gesunde Organismus besitzt eine Immuntoleranz, das heißt er bildet gegen eigene antigene Strukturen (Proteine, Zellen) keine Antikörper.

Die Ontogenese der Lymphocyten wird in Abb. 1 gezeigt. Im Knochenmark befinden sich die multipotenten Stammzellen, welche zu lymphatischen Stammzellen differenzieren können. Nach Einwanderung in die primären lymphatischen Organe proliferieren und differenzieren sie zu immunkompetenten, antigensensiblen Lymphocyten. Unter dem Einfluß des Thymus entstehen T-Lymphocyten und unter dem Einfluß des Bursaäquivalents die B-Lymphocyten. Bei den T-Lymphocyten unterscheidet man zwischen nicht immunkompetenten T_1- und kompetenten T_2-Zellen. Letztere verlassen den Thymus und siedeln sich in den peripheren lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten) an[50-54]. Die B- und T-Zellen lassen sich durch charakteristische Antigenrezeptoren auf ihrer Oberfläche unterscheiden[57,58]. Nach dem Kontakt mit dem Antigen beginnt sich die antigengeprägte Zelle zu teilen. Es entstehen Blastenzellen, welche sich weiter teilen und differenzieren. Bei den für die humorale Abwehr verantwortlichen B-Lymphocyten bildet sich ein Teil zu kleinen Lymphocyten zurück, den sogenannten Memoryzellen. Dadurch wird bei erneutem Antigenkontakt eine schnellere und stärkere Immunantwort erreicht. Der andere Teil wird zur Immunoglobuline produzierenden Plasmazelle[59,60].

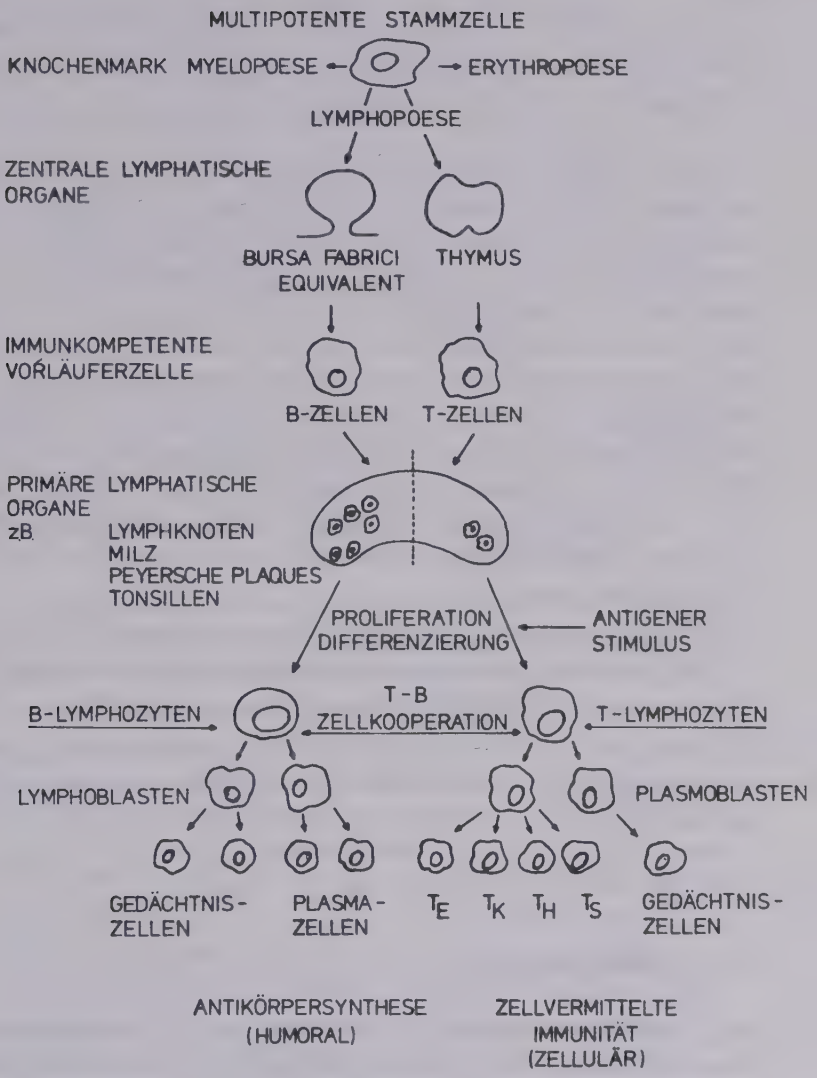


Abb. 1: Die Entwicklung des Immunsystems.
T_E = T-Effektorzelle (Lymphokine), T_K = Killerzelle
T_S = T-Suppressorzelle, T_H = T-Helferzelle

Für die Induktion der Antikörperbildung ist eine Zusammenarbeit mit sog. T-Helferzellen notwendig. Über die genaue Wechselwirkung zwischen Antigen, B-Zelle und T-Helferzelle bestehen zur Zeit noch mehrere Modelle.

Aus der T_2-Zelle entstehen mehrere Subpopulationen, unter anderem die obengenannte T-Helferzelle. T-Suppressorzellen sorgen z.B. dafür, daß die Antikörperproduktion nicht hemmungslos abläuft. Sie kann humorale und zelluläre Immunreaktionen unterdrücken. Die T-Killerzellen bilden eine weitere Subpopulation. Sie besitzen eine antigenspezifische cytotoxische Aktivität und können andere Zellen (z.B. Krebszellen), welche auf ihrer Oberfläche die entsprechenden Antigene tragen, beim direkten Kontakt abtöten[61-85]. Eine weitere Gruppe von T-Lymphocyten, die T-Effektorzellen, produzieren sog. Lymphokine, welche in starkem Maße die Makrophagen beeinflussen. Bis heute kennt man drei dieser Faktoren:

1) den "migration inhibiting factor" (MIF)[86]
2) den "specific macrophage arming factor" (SMAF)
3) den "macrophage activating factor" (MAF)

Dies zeigt, daß das T-Zellsystem eine die Immunantwort auf allen Ebenen beeinflussende und regulierende Funktion besitzt[87-92].

II.3. Immunkrankheiten

Bei den Immundefekten unterscheidet man zwischen primären Immundefekten (PID), welche die Folge einer Störung bei der Entwicklung des Immunsystems sind, und den sekundären Immundefekten (SID) als Folge von Krankheiten oder bestimmten therapeutischen Maßnahmen (z.B. immunsuppressive Behandlung)[32,93-96]. Je nachdem, auf welcher zellulären Stufe der Entwicklungsdefekt vermutet wird, unterteilt man die PID in Stammzell-, B-Zell- oder T-Zelldefekt. Beispiele

für primäre Immundefekte sind die Agammaglobulinämie nach Bruton[97] (nur die humorale Immunantwort ist gestört) und nach Schweizer (bei dieser Krankheit sind sowohl Antikörpersynthese als auch die Ausbildung der zellvermittelten Immunität gestört) sowie die Thymusaplasie (DiGeorge-Syndrom[98-99], Fehlen der T-Zell vermittelten Reaktion). Des weiteren gehören dazu das Wiskott-Aldrich-Syndrom (Störung der B- und T-Zell-vermittelten Immunität) und die Ataxia telangiectasia[32,100] (stark verminderte Immunoglobulinspiegel mit Störung der zellulären Reaktion).

Zu den sekundären Immundefekten zählen das multible Myelom[101,102] (ungehemmte B-Zellproliferation mit Bildung monoklonaler, inaktiver Immunoglobuline), der Morbus Hodgkin[103,104] und das Waldenström-Syndrom (Paraproteinase mit monoklonaler IgM-Vermehrung im Blut, Makromoleküle).

Bei den Autoimmunkrankheiten ist die Immuntoleranz gestört. Immuntoleranz ist ein Zustand spezifischer immunologischer Nichtreaktivität nach Kontakt mit einem normal immunogenen Reiz (z.B. körpereigenes Eiweiß)[105,106]. Dies ist eine weitere Möglichkeit der Immunantwort eines Organismus. Sie entsteht durch Kontakt von Substanzen mit dem noch nicht ausgereiften Immunsystem im fetalen oder frühen postnatalen Leben. Zu den Autoimmunkrankheiten zählen Myasthenia gravis[32,107,108] (Bildung von AAK gegen die A-Bande der gestreiften Muskulatur und Markzellen des Thymus), rheumatoide Arthritis[94] (AAK (sog. Rheumafaktor) gegen IgG), Sjögren-Syndrom[94] (AAK gegen IgG und Mitochondrien), Hepatitis lupoidae[109] (antinukleäre Faktoren, AAK gegen glatte Muskulatur und Mitochondrien) und der Systemische Lupus Erythematodes (SLE)[110] (Bildung von AAK gegen DNS und Nukleoproteine).

II.4. Thymuspeptide

Nach dem Nachweis, daß die Funktion des Thymus zum Teil auf humoralen Faktoren beruht, wurden mehr oder weniger gereinigte Thymusextrakte, bzw. die später isolierten definierten Peptide in die Therapie eingeführt[111]. Der Einsatz bei chronischen Infektionen[112-115], Immunkrankheiten[116-122], Autoimmunkrankheiten[123,124] und in der Krebstherapie[125-132] erfolgte zum Teil mit guten Ergebnissen.

Bis heute konnten folgende Peptide isoliert und teilweise in ihrer Struktur aufgeklärt werden: Thymosin α_1, Thymosin α_7, Thymosin β_1, Thymosin β_3, Thymosin β_4, Thymosin β_8, Thymosin β_9, Thymosin β_{10}, Thymopoietin I, Thymopoietin II, Thymopoietin III, Facteur Thymic Serique (FTS), Humoraler Thymus Faktor (THF), Serum Faktor (SF), Thymon A, Thymon B und Thymon C.

Des weiteren sollen noch Thymosin α_2 - α_{10}, Thymosin β_2, β_5 und β_6 rein isoliert worden sein, bis jetzt fehlt jedoch die Strukturangabe.

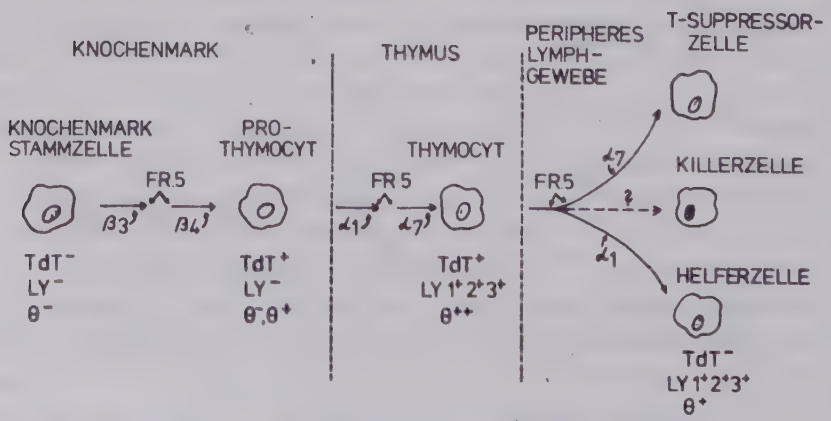


Abb. 2: Wahrscheinliche Angriffsstellen der Thymuspeptide bei der Reifung von T-Zellsubpopulationen (TdT = Terminale Desoxynucleotidyltransferase; θ, Ly = Oberflächenantigene

II.4.1. Thymosin Fraktion 5 (TF 5)

TF 5 ist ein teilweise gereinigtes, aus über 30 Peptiden bestehendes Gemisch, welches nach 5 Aufarbeitungsschritten aus Thymusgewebe erhalten wird[2,134,135]. Es konnte gezeigt werden, daß TF 5 an Stelle des Thymus die immunologische Funktion in thymektomierten oder in defekten Organismen teilweise oder vollständig wiederherstellen kann[136-138]. TF 5 zeigt biologische Aktivität im E-Rosetten-Test[139], im cytotoxischen Test (θ und TL-Antigene)[140], im "Graft versus Host"-(GvH)-Test[137] und im "Mixed-Lymphocytes-Culture" (MLC)-Test[141,142]. Weiterhin erhöht TF 5 den intrazellulären c-GMP-Spiegel in Lymphocyten[143], steigert die mitogene Aktivität von Lymphocyten[144] und induziert in Knochenmarkszellen die TdT[145,146]. Außerdem zeigt TF 5 Corticotropin-freisetzende Aktivität in Primaten und erhöht den ß-Endorphin- und Cortisonspiegel[147]. TF 5 wird seit längerer Zeit schon in klinischen Versuchen bei primären und sekundären Immunkrankheiten, Autoimmunkrankheiten, sowie verschiedenen Krebsarten eingesetzt[142,148,149].

II.4.2. Thymosin α_1

Dies war das erste Polypeptid, welches mit Hilfe des E-Rosetten-Tests rein aus TF 5 isoliert werden konnte und dessen Struktur bestimmt wurde[134,150]. Es besteht aus 28 Aminosäuren mit blockiertem Aminoende und einem Molekulargewicht von 3108 D[151]. Die Primärstruktur wurde 1983 bestätigt[152]. Thymosin α_1 wurde nach klassischen, Festphasen- und gentechnischen Methoden synthetisiert[153-162]. Seine biologische Aktivität liegt in einigen Tests 10 bis 1000 mal höher als TF 5, aber in anderen ist es dafür inaktiv[133,145]. Sehr empfindlich kann Thymosin α_1 mit Hilfe eines neuen micro-ELISA nachgewiesen werden[163]. Es wird in der Krebstherapie eingesetzt[164].

II.4.3. Thymosin α_7

Es gehört zu den sauren Peptiden mit einem IP von ungefähr 3.5 und einem Molekulargewicht von 2200 D und wurde aus TF 5 isoliert. Thymosin α_7 soll die Bildung von Suppressorzellen aus Prothymocyten bei Patienten mit SLE induzieren[165].

II.4.4. Thymosin β_1

Dieses Polypeptid wird als Hauptbande bei der isoelektrischen Fokussierung von TF 5 gefunden. Es wird ebenfalls aus TF 5 isoliert[166] und hat ein Molekulargewicht von 8451 D und einen IP von 6.7. Die Sequenz des aus 78 Aminosäuren bestehenden Thymosin β_1 ist aufgeklärt[167]. Durch Vergleich kann gezeigt werden, daß die Aminosäurensequenz mit Ubiquitin identisch ist[168]. Es zeigt in den unterschiedlichsten Tests keine biologische Aktivität[133]. Über Synthesen von Thymosin β_1 ist nichts bekannt.

II.4.5. Thymosin β_3

Thymosin β_3 wird erstmals von Low et al. erwähnt[133]. Es soll sich um eine dem Thymosin β_4 eng verwandte Verbindung mit ca. 48 Aminosäuren, einem ungefähren Molekulargewicht von 5500 D und einem IP von 5.2 handeln. Von Thymosin β_4 soll es sich nur am Carboxylende um 8 Aminosäuren unterscheiden.

II.4.6. Thymosin β_4

Dieses aus 43 Aminosäuren bestehende Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 4982 D und einem IP von 5.1 wurde 1981 ebenfalls aus TF 5 isoliert und sequenziert[169,170]. Es kann jedoch gezeigt werden, daß es auch in vielen anderen Geweben und athymischen Mäusen vorkommt. Es ist also kein thymusspezifisches Peptid[171,172]. Biologische Aktivität findet man im TdT-Test. Von Thymosin β_4 sind in der Literatur Festphasensynthesen[173,174], klassische Synthesen[175] und biologische in vitro-Synthesen[176,177] beschrieben.

II.4.7. Thymosin β_8 und Thymosin β_9

Nach Vergleich der Aminosäurensequenzen der mit einer HPLC-Methode isolierten Peptide Thymosin β_8 und β_9 wird deutlich, daß Thymosin β_8 vermutlich während der Isolation aus dem Thymusgewebe aus Thymosin β_9 entsteht. Letzteres besitzt nur 2 Aminosäuren (-Ala-Lys-) mehr am Carboxylende. Die restliche Sequenz ist völlig identisch. Thymosin β_8 (4518 D) besteht aus 39 Aminosäuren und Thymosin β_9 (4717 D) aus 41 Aminosäuren. Das Aminoende ist wieder durch eine Acetylgruppe blockiert[178-180]. Bis jetzt ist erst je eine Synthese von beiden Peptiden bekannt[181,182]. Thymosin β_9 ist im E-Rosetten-Test mit Lymphocyten aus dem Blut von Lupus-nephritis-Patienten aktiv.

II.4.8. Thymosin β_{10}

Bei der Untersuchung von Geweben (Milz, Leber, Thymus) unterschiedlicher Spezies (Ratte, Maus, Mensch) konnte ein neues, den Thymuspeptiden verwandtes Peptid isoliert werden[183]. Thymosin β_{10} zeigt 75 %ige Sequenzhomologie zu Thymosin β_4 und unterscheidet sich von Thymosin β_9 nur in

der Position 6 und 10, sowie am Carboxylende (86 %ige Homologie). In Säugetierzellen findet man immer Thymosin $ß_4$ zusammen mit Thymosin $ß_9$ oder $ß_{10}$, wobei Thymosin $ß_9$ für das Gewebe von Kälbern spezifisch zu sein scheint. Aus Kaninchen wurde ebenfalls Thymosin $ß_{10}$ isoliert, jedoch mit einem zusätzlichen Argininrest nach Position 38[184].

II.4.9. Facteur Thymique Serique (FTS)

FTS wurde erstmals 1973 aus Serum isoliert[185,186]. Routinemäßig wird es aus Schweineserum gewonnen, obwohl es in den Seren der verschiedensten Säuger nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich um ein Nonapeptid mit einem Molekulargewicht von 859 D und einem IP von 7.5[187,188]. FTS muß zu den Thymushormonen gezählt werden, da es nach Thymektomie im Serum nicht mehr nachweisbar ist. Dafür sprechen auch die Nachweise von FTS in TF 5 und in den reticulo-epithelialen Zellen des Thymus[189-191]. Erst in jüngster Zeit konnte gezeigt werden, daß die Sekretion von FTS durch die Epithelzellen des Thymus einem feed-back-Mechanismus unterliegt[192]. FTS ist im E-Rosetten-Test biologisch aktiv[193]. Es bewirkt außerdem die Induktion von θ-Antigen auf θ-negativ rosettenbildenden Zellen[194], sowie von Suppressor-T-Zellen und Aktivierung von Helferzellen[195,196]. Auch die Aktivität der aus der Milz stammenden Natural-Killer-(NK)-Zellen wird durch FTS beeinflußt[208]. Der Faktor kann auch mit immunologischen Methoden (Radioimmunoassay) nachgewiesen werden[209]. Beim systemischen Lupus Erythematodes (SLE) und beim DiGeorge-Syndrom fehlt dieser Faktor, so daß hier eventuell ein Einsatzgebiet liegt[193, 197]. Von FTS und dessen Analogen sind eine Vielzahl von Synthesen beschrieben[198-206]. Synthetisches FTS wird bei der Behandlung von Immunkrankheiten eingesetzt[119, 207].

II.4.10. Humoraler Thymus Faktor (THF)

Erstmals wird 1969 über den aus Kalbsthymus isolierten THF berichtet[210-212]. Der aus vermutlich 31 Aminosäuren bestehende Faktor mit einem Molekulargewicht von 3220 D und einem IP von 5.6 ist noch nicht sequenziert. In einer späteren Arbeit wird THF als ein aus 27 Aminosäuren (13 verschiedene) bestehendes Peptid beschrieben[213]. Zum Nachweis seiner biologischen Wirkung wird die Reaktivität von Lymphocyten bei mitogener Stimulierung[214-216] und ihre Kapazität im MLC-Test bestimmt[217,218], sowie die Aktivität im GvH-Test in vitro[210,219] und E-Rosetten-Test[220]. Die bisherigen Versuche deuten darauf hin, daß der Einfluß auf die T-Lymphocyten über einen Anstieg des intrazellulären c-AMP-Spiegels erfolgt[212,218,221]. THF wurde mit Erfolg bei schwerer, ausgedehnter Adenovirusinfektion[222] und bei mit Immunsuppressiva behandelten Kindern mit lymphoproliferativer Neoplasie und allgemeiner Varizelleninfektion eingesetzt[112].

II.4.11. Serum Faktor (SF)

Astaldi et al. beschreiben einen Serumfaktor, dessen Charakterisierung bis heute noch nicht erfolgt ist[223]. Es soll sich um ein Peptid mit einem Molekulargewicht < 500 D und möglicherweise vier Aminosäuren handeln[224]. SF bewirkt spezifisch nur in Thymocyten einen Anstieg an c-AMP[223,225]. Seine Thymusabhängigkeit wird durch das Fehlen in thymektomierten Myasthenia-gravis-Patienten sowie bei Patienten mit DiGeorge-Syndrom und anderen schweren Immunkrankheiten, bewiesen[226,227].

II.4.12. Thymon A, Thymon B, Thymon C

Alle drei Thymone werden aus Rinderthymus gewonnen. Thymon A besteht wahrscheinlich aus 68-71 Aminosäuren (14 unterschiedliche) und einem Molekulargewicht von 7291-7677 D. Thymon B setzt sich aus 13 verschiedenen Aminosäuren zusammen und soll beträchtlich kleiner sein als Thymon A. Von Thymon C wird nur berichtet, daß die (^{3}H)-Thymidin-Einbaurate, sowie der intrazelluläre c-AMP- und c-GMP-Spiegel erhöht wird. Thymon A und B sind im (^{3}H)-Thymidin-Einbautest ebenfalls aktiv. Thymon A induziert jedoch nur einen Abstieg an c-AMP, während Thymon B nur den c-GMP-Spiegel erhöht[228-230].

II.4.13. Thymopoietin I, II und III (TP I, TP II, TP III)

TP I und TP II wurden 1974 von Goldstein aus Rinderthymus isoliert[231]. Sie beeinflussen die T-Zelldifferenzierung, speziell die Differenzierung von Prothymocyten zu Thymocyten[232, 233]. Die erste Sequenz von TP II[234] wurde gleichzeitig mit der Veröffentlichung der Sequenz von TP I und TP III 1981 revidiert[235]. Diese drei Peptide zeigen eine fast vollständige Sequenzhomologie. TP I und TP II unterscheiden sich nur in Position 1, 2 und 43; TP I und TP III nur in Position 1, 2 und 34 und TP II und TP III nur in Position 34 und 43. TP III wurde aus Rindermilz isoliert. In jüngster Zeit wurde eine dem Thymopoietin ähnliche Substanz in der menschlichen Haut nachgewiesen[236]. Als Biotest bei der Isolierung wurde der Effekt der verzögerten Schwächung der neuromuskulären Übertragung verwendet[231]. Durch eine chemische Synthese wurde gezeigt, daß das aktive Zentrum in der Sequenz 29-41 liegt[237]. Später konnte bewiesen werden, daß das Pentapeptid TP 5, welches der Sequenz 32-36 in TP II entspricht, fast die vollständige biologische Aktivität von TP II besitzt[238]. TP 5 zeigt immunregulatorische Aktivität in einer Vielzahl von Modellsystemen[239-243]. Es wird schon bei Myasthenia gravis[244], rheumatoider Arthri-

tis[245], "severe combined immunodeficiency" (SCID)[116] und beim DiGeorge-Syndrom[250] eingesetzt. Als einziges der drei Thymopoietine ist bis jetzt das TP II synthetisiert worden[246-248]. Für klinische Zwecke wird das einfacher zu synthetisierende TP 5, das ja volle biologische Aktivität zeigt, verwendet. Es besitzt jedoch nur eine kurze Halbwertszeit im Plasma[249]. Das TP 5 (Thymopoietin II 32-36) wird sowohl nach der Festphasenmethode, als auch nach klassischen Methoden dargestellt[251-257]. Auch eine "Liquid-Phase"-Methode ist beschrieben[258].

II.4.14. Thymic Polypeptide A

Aus Kalbsthymus konnte ein Peptid mit Namen Thymic Polypeptide A isoliert werden. Es ist in der Elektrophorese homogen und besteht aus 27 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 3610-4000 D und einem IP von 3.9. Die Aktivität im E-Rosetten-Test ist 20 mal größer als im Rohextrakt. Die Aminosäurenzusammensetzung soll sich von den bis jetzt bekannten Thymuspeptiden unterscheiden[259].

III. THEMENSTELLUNG

Die in den letzten zwei Jahrzehnten auf dem Gebiet der Thymusforschung gemachten Ergebnisse haben eindeutig bewiesen, daß dem Thymus eine überragende Rolle bei der Entwicklung und Erhaltung des Immunsystems zukommt. Die klinische Verwendbarkeit von mehr oder weniger gereinigten Thymusextrakten bei schweren Immunmangelkrankheiten, Autoimmunkrankheiten und Tumoren ist ebenfalls gesichert. Für genauere Aussagen bezüglich der Funktionsweise der bis jetzt mühsam aus Thymusextrakten isolierten Peptide sind jedoch größere Men-

gen notwendig. Auch für weitere klinische Untersuchungen werden einheitliche Substanzen bevorzugt. Deshalb ist man auch heute noch auf die synthetisch hergestellten Peptide angewiesen, wobei die klassische Synthese zudem noch den Beweis für eine vorgeschlagene Sequenz liefert.

Es soll das Fragment 1-7 von Thymosin β_9 auf mehreren Wegen und nur mit acidolytisch abspaltbaren Schutzgruppen dargestellt werden. Außerdem soll die vollständig geschützte Sequenz mit freier Carboxylgruppe und als Methylester zur möglichen Kupplung mit dem Fragment Thymosin β_9 (8-41) in ausreichenden Mengen verfügbar gemacht werden. Die Synthese erfolgt nach klassischen Methoden in Lösung, da die Darstellung biologisch aktiver Peptide nach der Festphasenmethode häufig zu Rumpf- und Fehlsequenzen führt, welche unter Umständen schwer vom Hauptprodukt abzutrennen sind.

Die neue, extrem säurelabile 1-(3,5-Di-tert-butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl-(t-Bumeoc)-Gruppe soll durch den Einsatz bei der Synthese des Fragments 1-7 auf ihre Verwendbarkeit bei der Darstellung von größeren Peptiden überprüft werden. Ihre Abspaltungskinetik und die Selektivität neben zwei tert-Butylester- und einer N^{ε}-Boc-Gruppe wird mittels HPLC untersucht.

Zwischenverbindungen werden durch Schmelzpunkt, Drehwert, Elementaranalyse, ^{13}C-NMR-Messung, FD-MS-Spektrum und Aminosäurenanalyse charakterisiert.

Das freie Peptid wird auf seine biologische Aktivität in Zellkulturen (Proliferation von humanen Tumorzellen und diploiden Fibroblasten) und am Tier (Meth.A.-Tumor in Mäusen) untersucht.

IV. SPEZIELLER TEIL

IV.1. Überlegungen zur Synthese

Thymosin β_9 (1-7) ist ein lineares Peptid mit folgender Primärstruktur:
Ac-L-Ala-L-Asp-L-Lys-L-Pro-L-Asp-L-Leu-Gly-OH
Drei der sieben Aminosäuren besitzen eine dritte funktionelle Gruppe. Diese können im Verlauf der Peptidsynthese zu Nebenreaktionen führen und müssen zur Eindeutigkeit bei der Kettenverlängerung - ebenso wie die nicht benötigte Carboxyl- und Aminofunktion - während der Kupplung geschützt sein.

Besonders die Asparaginsäure neigt zu vielen Nebenreaktionen. Dazu gehört die leichte Bildung von Succinimidderivaten, auch bei ß-geschützten Asparaginsäurepeptiden[260-262]. Die Benzylestergruppe führt vor allem bei der sauren Deblockierung zu dieser Nebenreaktion[264,265]. Diese Reaktion ist reversibel und bei Ringöffnung entstehen hauptsächlich ß-Asparaginsäurederivate[263]. Eine freie ß-Carboxylgruppe aber kann Anlaß zur Bildung von verzweigten Peptiden sein. Als beste Schutzgruppe zur Verhinderung der Succinimidbildung hat sich der tert.-Butylrest in Form des Esters erwiesen[266]. Der Schutz der ß-Carboxylfunktion ist auch notwendig, um bei der Aktivierung der α-Funktion mit DCCI eine Anhydridbildung zu verhindern.

Der Schutz der ε-Aminofunktion des Lysins ist zwingend erforderlich, da sie ein gutes Nucleophil darstellt und bei Kupplungsreaktionen in Konkurrenz zur α-Aminogruppe treten kann.

In dieser Arbeit soll die sogenannte "konventionelle Synthese" angewendet werden. Hierbei gibt es die Möglichkeit des Minimalschutzes nach Hirschmann und Veber[267], oder die des Maximalschutzes. Erstere kann hier nicht verwendet werden. Bei der zweiten Möglichkeit wird als konstanter

Schutz der Drittfunktionen der tert.-Butylrest als Ester für die ß-Carboxylfunktion der Asparaginsäure und die tert.-Butyloxycarbonyl(Boc)-Gruppe[270-271] für die ε-Aminofunktion des Lysins eingesetzt. Beide Schutzgruppen können mit Säuren wieder abgespalten werden. Als intermediärer Schutz der α-Aminofunktion wird die hydrogenolytisch abspaltbare Benzyloxycarbonyl(Z)-Gruppe, bzw. der neben anderen säurelabilen Schutzgruppen selektiv abspaltbare 1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl(t-Bumeoc)-Rest verwendet[269] (Schwyzer-Taktik)[273]. Durch die Verwendung dieser hydrophoben Gruppen wird die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln stark gesteigert, so daß selbst höhere Peptide noch in Essigester löslich sind und somit durch konventionelles Waschen leicht gereinigt werden können.

Das Konzept der acidolytisch abspaltbaren Schutzgruppen in den Seitenketten ist auch bei der Deblockierung am Ende der Synthese von Vorteil, da unter relativ milden Bedingungen eine Freisetzung erfolgen kann. Dadurch wird eine HF-Hydrolyse vermieden, welche nicht nur einen speziellen apparativen Aufwand erfordert, sondern auch Anlaß zur Bildung von Nebenprodukten sein kann.

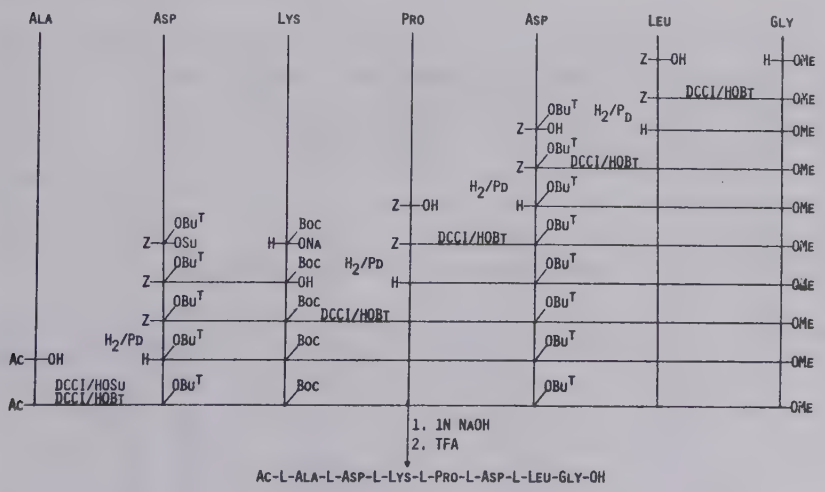
Die biologische Aktivität einer Verbindung ist von ihrer optischen Reinheit abhängig. Daher sollten nur solche Kondensationsmethoden verwendet werden, die einheitliche Produkte liefern. Als racemisierungssicher gelten die DCCI/HOBt[274-276]-, DOCI/HOSu-[277-279] und Azidkupplung nach Honzl-Rudinger[280]. Da die alkalische Verseifung von Aminosäure- oder Peptidestern oft unter Racemisierung und Bildung von Nebenprodukten verläuft[281,282], soll sie so wenig wie möglich eingesetzt werden. Die beiden im Peptid vorkommenden ß-tert.-Butylester der Asparaginsäure werden unter den Verseifungsbedingungen ebenfalls teilweise hydrolysiert, was auch in der Literatur beschrieben wird[283,284].

Der Methylester als Carboxylschutzgruppe wird trotzdem eingesetzt, um zu untersuchen, ob nicht geeignete Bedingungen gefunden werden können, unter denen sich in einer kinetisch kontrollierten Reaktion, nur der Glycinmethylester verseifen läßt.

IV.2. Synthese des Thymosin β_9 (1-7)

IV.2.1. Syntheseweg 1

Für die Synthese des Thymosin β_9 soll eine durchgehend einheitliche Strategie verwendet werden, sowie eine möglichst geringe Anzahl an unterschiedlichen Ausgangsverbindungen. Deshalb wird das Fragment in einer 1+(2+4)-Kondensation vom Carboxyende her aufgebaut.



Syntheseschema 1: Darstellung von Thymosin β_9 (1-7)

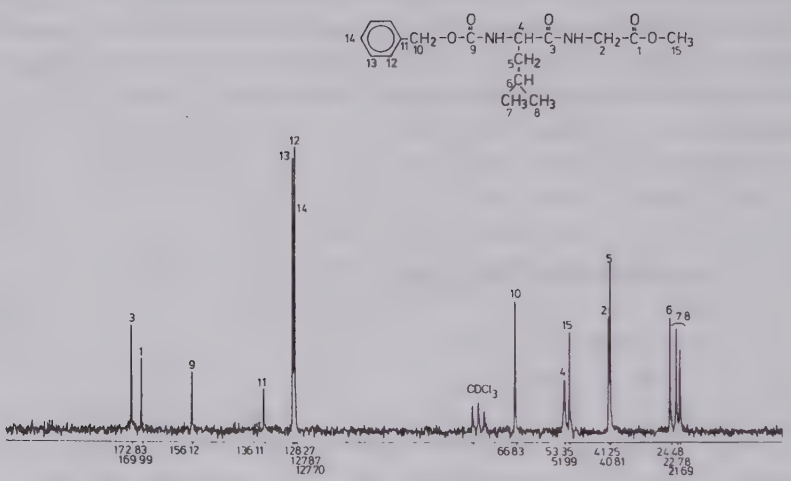


Abb. 3: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Leu-Gly-OMe, 200 mg in 2 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt.

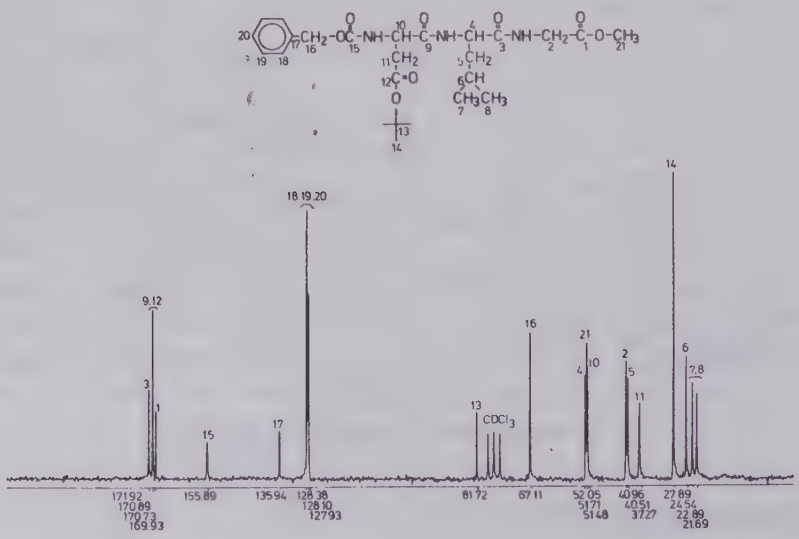


Abb. 4: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe, 200 mg in 2 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt.

In einer DCCI/HOBt-Kupplung wird Z-Leu-OH mit H-Gly-OMe.HCl zum beidseitig geschützten Dipeptid in 88 %iger Ausbeute umgesetz. Nach hydrogenolytischer Entfernung der Carbobenzoxygruppe wird mit Z-Asp(OBu^t)-OH unter Zusatz von DCCI/HOBt zum Tripeptid kondensiert. Auch diese Reaktion verläuft schnell und in hohen Ausbeuten (91 %).

Bei der Darstellung des Ausgangsderivats Z-Asp(OBu^t)-OH traten Probleme auf. So gestaltet sich die Umkristallisation von Z-Asp-Anhydrid schwierig, da eine Reinheitskontrolle mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nicht möglich ist (Zersetzung auf der DC-Platte). Wie sich bei verschiedenen Umsätzen herausstellt, kann das Rohprodukt eingesetzt werden, ohne daß die Ausbeute an Z-Asp-ONb.DCHA geringer wird. Bei dieser Umsetzung tritt immer ein Nebenprodukt auf. Nach mehrmaliger Kristallisation wird eine chromatographisch einheitliche Fraktion erhalten. Durch Vergleich der physikalischen Daten kann gezeigt werden, daß es sich um Z-Asp-(ß-ONb)-OH.DCHA handelt.

	F_p °C	$[\alpha]_D$ (c=1.00,95%HAc)	Rf_D	Elementaranalyse
				Ber: C 63.79 H 7.08 N 7.20
α-ONb	155-156	-11.1	0.50	Gef: C 63.79 H 7.14 N 7.14
ß-ONb	138-141	+ 4.2	0.40	Gef: C 63.66 H 7.16 N 7.15

Tab. 1: Vergleich der physikalischen Werte von Z-Asp(OH.DCHA)-ONb und Z-Asp(ONb)-OH.DCHA

Abb. 5: Vergleich der ^{13}C-NMR-Spektren von Z-Asp(OH.DCHA)--ONb und Z-Asp(ß-ONb)-OH.DCHA

Bei der weiteren Reaktion von Z-Asp(OBu^t)-ONb sollte auf einen vollständigen Umsatz geachtet werden, da sich unumgesetztes Ausgangsprodukt nur schwer entfernen läßt. Die Umkristallisation gelingt im Gegensatz zur Literatur sehr gut aus MeOH.

Die Abspaltung der Aminoschutzgruppe von Z-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe bei pH 6.5 ergibt ein nicht ganz einheitliches, schaumiges Produkt, welches nicht kristallisiert werden kann. Das nach Umsetzung von Z-Pro-OH mit H-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe.HCl unter Zusatz von DCCI/HOBt erhaltene Produkt kann durch mehrmaliges Umkristallisieren aus EE/PE dünnschichtchromatographisch einheitlich erhalten werden. Der an dieser Stelle durchgeführte Racemattest ergibt: 0.1 % D-Pro, 0.6 % D-Asp, o.6 % D-Leu.

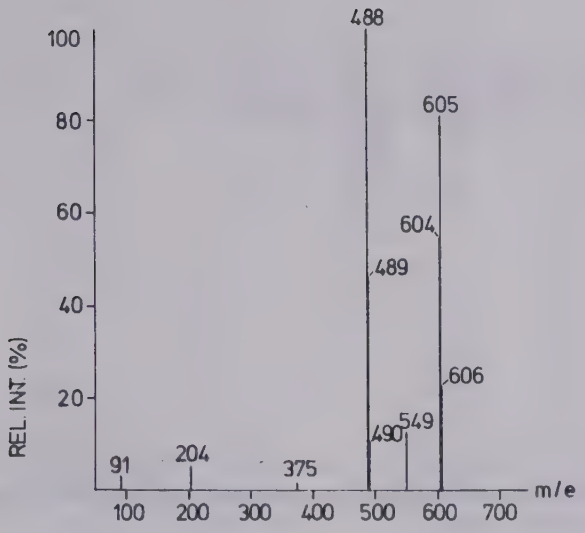


Abb. 6: FD-MS-Spektrum von Z-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe
Temperatur 50° C, Lösungsmittel $CHCl_3$

Interpretation der wichtigsten Fragmentionen:

m/e	Fragmentionen
605	M^+
488	M^+ - tert.-Butyl$^+$, - CH_3OH, - CO
549	M^+ - Isobutylen
375	(H-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe)$^+$
204	Z-Pro$^+$
91	$C_7H_7^+$

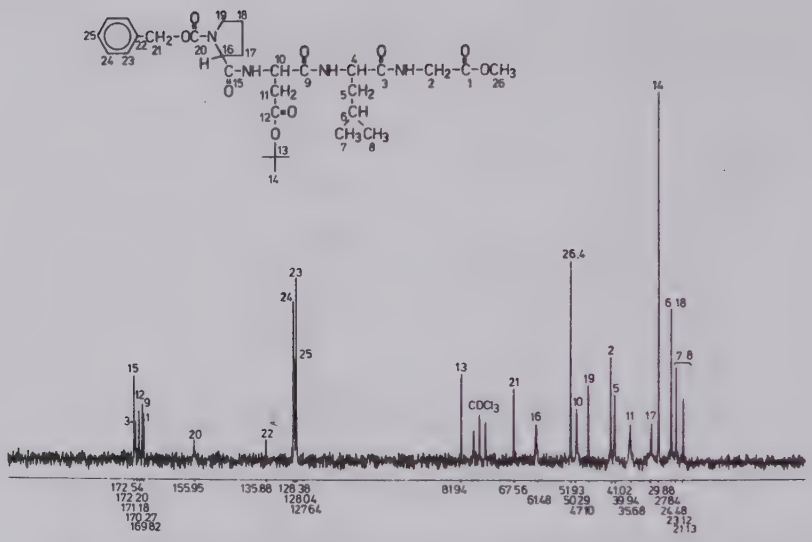


Abb. 7: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe, 210 mg in 2 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt.

Um das Konzept, bei der Synthese von Thymosin β_9, so wenig wie möglich verschiedene Ausgangsderivate zu verwenden, durchführen zu können, wird nun zuerst das Zweierpeptid Z-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OH synthetisiert. Es kann als DCHA-Salz kristallin erhalten werden. Die Kupplung erfolgt mit Z-Asp(OBu^t)-OSu und H-Lys(Boc)-OH als Natriumsalz in DMF.

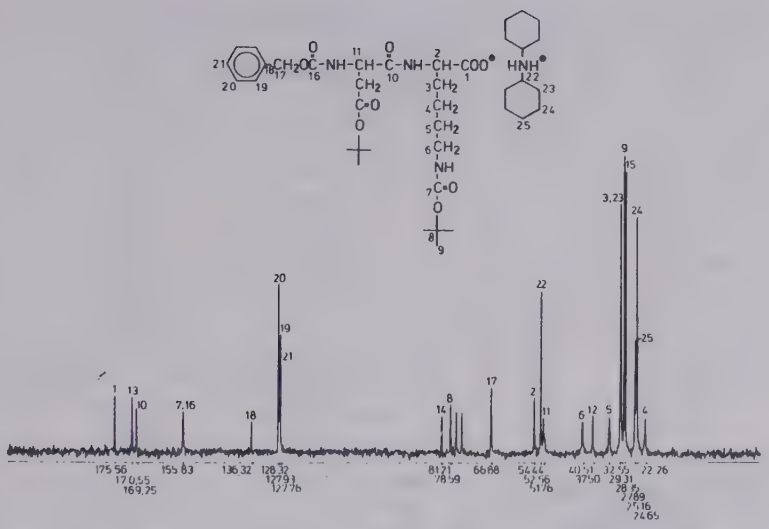


Abb. 8: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OH.DCHA, 220 mg in 2 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt.

Das gewünschte Hexapeptid Z-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp-(OBu^t)-Leu-Gly-OMe erhält man in guten Ausbeuten nach üblicher Entacylierung von Z-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe mit 10 % Palladium auf Aktivkohle und DCCI/HOBt-Kupplung mit der freigesetzten Carboxylcomponente Z-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OH. Das Produkt kann leicht durch Kristallisation aus Ether gereinigt werden, was durch die stark hydrophobe Wirkung der drei im Molekül vorhandenen tert.-Butylgruppen bewirkt wird.

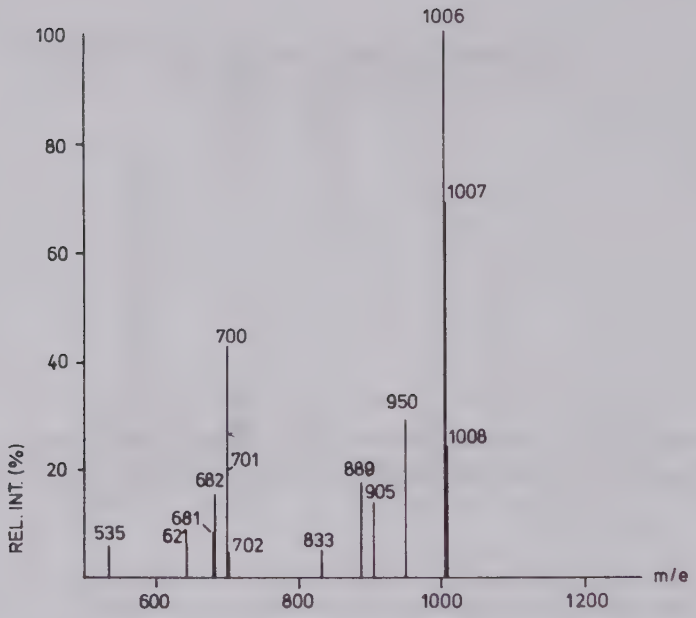


Abb. 9: FD-MS-Spektrum von Z-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe, Temperatur 50° C, Lösungsmittel $CHCl_3$.

Interpretation der wichtigsten Fragmentionen:

m/e	Fragmentionen
1006	$(M + 2H)^+$
950	M^+ - Isobutylen
905	M^+ - Boc
888	M^+ - 2 x tert.-Butanol
833	888 - Isobutylen
700	M^+ - $(Z\text{-Asp}(OBu^t)\text{-C}\equiv O)^+$
682	700 - H_2O
621	M^+ - Boc, -Z, -2 x tert.-Butanol
535	$(Z\text{-Asp}(OBu^t)\text{-Lys(Boc)-C}\equiv O)^+$

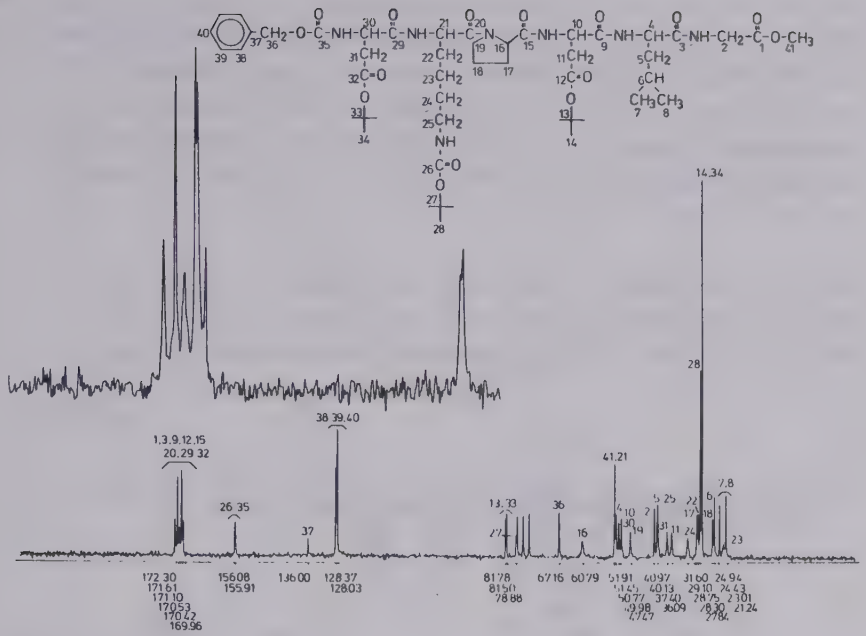


Abb. 10: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp-(OBu^t)-Leu-Gly-OMe, 200 mg in 2 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt.

Das Hexapeptid wird durch Elementaranalyse, Aminosäurenanalyse, ^{13}C-NMR-Spektrum und Felddesorptionsmassenspektrum charakterisiert. Die Hydrierung der Carbobenzoxygruppe von Z-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe verläuft nicht so eindeutig wie erwartet. Im DC sind einige Verunreinigungen sichtbar, welche aber nach Aufnahme in Essigester durch Waschen mit 5 %iger $NaHCO_3$ und Citronensäure vollständig entfernt werden können. H-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe wird aus der sauren Waschphase nach Neutralisieren durch Extraktion mit Essigester rein isoliert. Die weitere Umsetzung zum Heptapeptid erfolgt einmal mit Ac-Ala-OH und DCCI/HOBt, sowie mit Ac-Ala-OSu. Hier verläuft die Aktivestermethode mit N-Hydroxysuccinimid in größerer Ausbeute (83 %), als die Kupplung mit

DCCI/HOBt (60 %). Besonders auffallend ist die Differenz für die beiden Methoden im Racemattest (siehe Experimenteller Teil). Da bei beiden Versuchen von derselben Verbindung ausgegangen wird, beruhen die Differenzen für Asparaginsäure und Lysin vermutlich auf den unterschiedlichen Hydrolysebedingungen (Methode I: 16 h bei 120° C, Methode II: 4 h bei 110° C).

Diese Beobachtung wurde schon von Frank et al. beschrieben[285]. Der Unterschied bei Alanin kann aber auch auf die unterschiedliche Kupplungsmethode zurückzuführen sein.

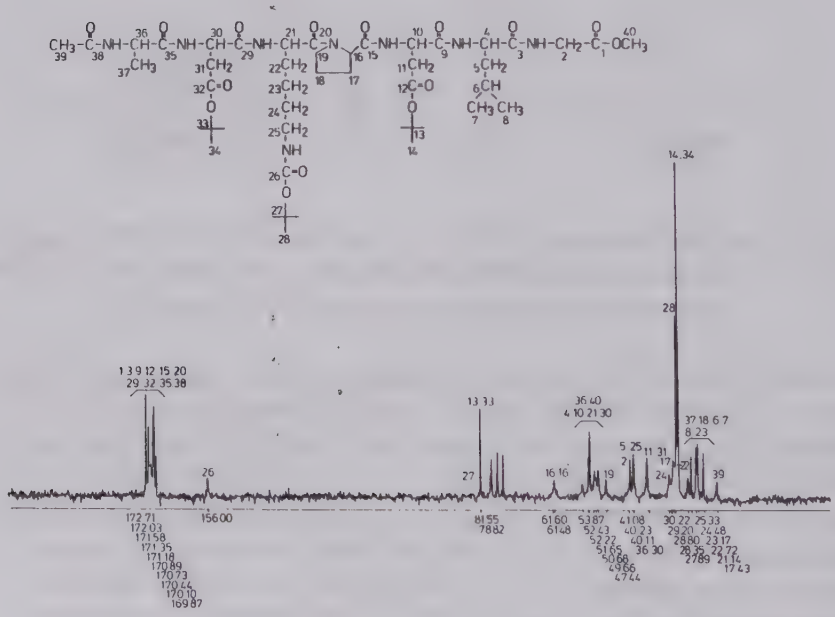


Abb. 11: ^{13}C-NMR-Spektrum von Ac-Ala-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe, 180 mg in 1.5 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt.

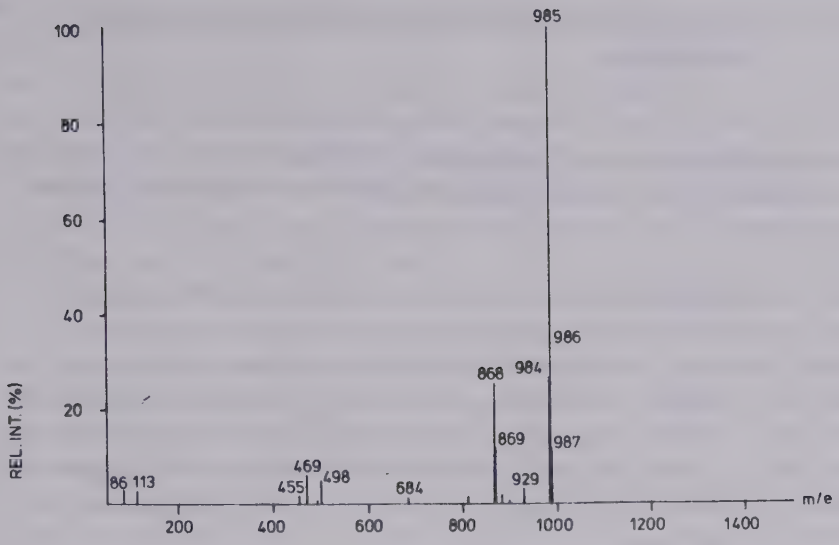


Abb. 12: FD-MS-Spektrum von Ac-Ala-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe, Temperatur 50° C, Lösungsmittel $CHCl_3$.

Interpretation der wichtigsten Fragmentionen:

m/e	Fragmention
985	$(M + 2H)^+$
929	M^+ - Isobutylen
868	M^+ - 2 x tert.-Butyl
684	M^+ - (Asp(C≡O)-Leu-Gly-OMe)$^+$
498	(O=C=N-Ala-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-C≡O)$^+$
469	(Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe)$^+$
113	Ac-Ala-C≡O)$^+$
86	$N{=}C{-}CO{-}OCH_3$

IV.2.2. Abspaltung der Schutzgruppen und Reinigung von Thymosin β_9

Da der größte Teil des geschützten Heptapeptids für die weitere Kupplung zum Thymosin β_9 benötigt wird, soll nur ein kleiner Teil für biologische Untersuchungen zum freien Thymosin β_9 (1-7) umgesetzt werden.

Die Verseifung von 390 mg vollgeschütztem Thymosin β_9 (1-7) mit 1N NaOH geschieht unter DC-Kontrolle. Es zeigt sich, daß nach 60 Minuten das Ausgangsprodukt verschwunden ist, während sich drei neue Verbindungen gebildet haben. Das erste Nebenprodukt tritt erst nach 30 Minuten auf, das zweite kurz vor Ende der Reaktion. Dies beruht vermutlich auf der teilweisen Alkalilabilität der beiden tert.-Butylestergruppen[283, 284].

Die restlichen säurelabilen Schutzgruppen werden durch Behandeln mit Trifluoressigsäure entfernt. Das nach Fällen mit Ether erhaltene Rohprodukt wird in 0.05 M NH_4Ac-Puffer, pH 7.4, gelöst und über Sephadex G 15 mit demselben Puffer chromatographiert (Säule 100 x 2.5 cm, 5 cm/h, Fraktionen à 5 ml).

Nur im System n-Butanol/HAc/H_2O (4:1:5, Oberphase) sieht man eine schwache Verunreinigung mit fast identischem Rf-Wert. Es wird deshalb über zwei hintereinandergeschaltete Kieselgel-Fertigsäulen, Lobar Größe A der Fa. Merck, mit obiger Mischung als Eluens rechromatographiert (30 ml/h, Fraktionen à 4 ml). Die Detektion erfolgt durch Tüpfeln von 4 µl jedes zweiten Glases auf einer DC-Platte (10 x 20 cm), Entwickeln in System C und anschließendem Besprühen mit Ninhydrin.

Man erhält zwei Fraktionen à 40 mg bzw. 160 mg. Nur die zweite Fraktion gibt bei der Aminosäurenanalyse die erwarteten Werte.

IV.2.3. Syntheseweg 2

Das Peptid soll unter dem Gesichtspunkt synthetisiert werden, daß es einfach und in guten Ausbeuten mit dem Fragment Thymosin β_9 (8-41), welches ebenfalls von unserer Arbeitsgruppe synthetisiert wird, gekuppelt werden kann. Ausgehend vom Heptapeptidmethylester, steht als Alternative zur Azidkupplung die DCCI/HOBt-Kupplung zur Verfügung. Voraussetzung hierfür ist jedoch eine freie Carboxylgruppe. Diese kann durch eine einfache Verseifung nicht erhalten werden, da sich die beiden tert.-Butylestergruppen nicht als alkalistabil erweisen. Auch die Möglichkeit, auf der Stufe von Teilsequenzen den Methylester zu verseifen, schlagen fehl. Die ersten Versuche werden mit dem Tripeptid Z-Asp-(OBu^t)-Leu-Gly-OMe durchgeführt. Hier wird der Methylester innerhalb von 15 Minuten verseift. Jedoch tritt immer eine große Menge an Nebenprodukt auf. Auch verläuft die Verseifung nie vollständig, da ein Teil der NaOH bei der Spaltung des tert.-Butylesters verbraucht wird.
Von den drei getesteten Lösungsmitteln Aceton, Dioxan und Methanol erweist sich letzteres als das am besten geeignete. Die Konzentration der Natronlauge (2N, 1N, 0.5N) zeigt nur wenig Einfluß auf die Menge an Nebenprodukt. Das Verhältnis von Produkt zu Nebenprodukt beträgt immer annähernd 50 %. Eine Änderung im Verseifungsverhalten wird nach Kuppeln zum Z-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe erwartet. Bei mehreren Versuchen erweist sich der Anteil an Nebenprodukt nicht so hoch wie beim Tripeptid.

Die besten Ergebnisse erhält man bei Erniedrigung der Temperatur auf 0^o C. Der Methylester wird noch ausreichend schnell verseift, während der tert.-Butylester fast vollständig stabil bleibt. Man erhält jedoch nie eine 100 %ige Umsetzung, da zu langes Rühren, bzw. ein zu großer Überschuß an Natronlauge zur stärkeren Bildung von Nebenprodukten führt. Aufgrund dieser Versuche werden 12 g (19.8 Mol) Z-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe in MeOH gelöst und mit 1N NaOH (10 % überschuß) verseift. Nach 20 Minuten wird neutrali-

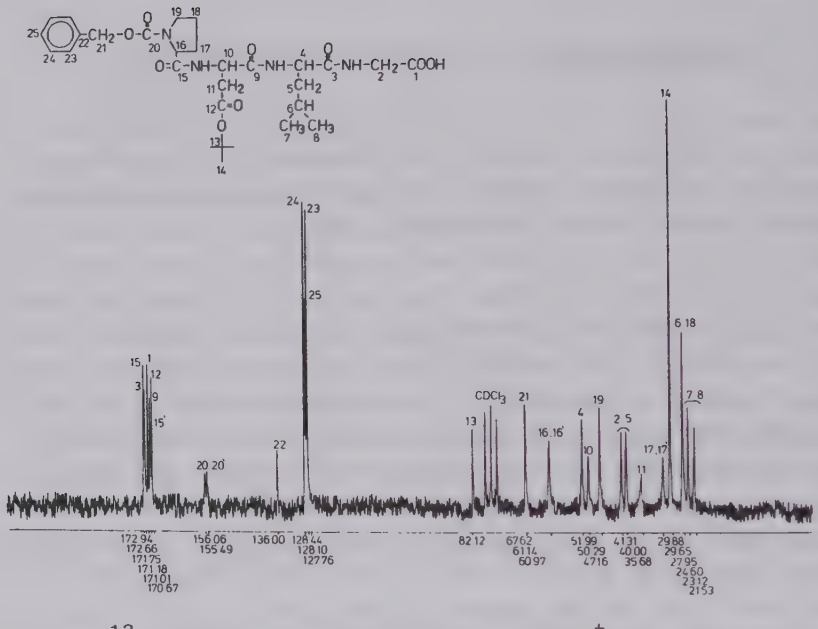


Abb. 13: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OH, 220 mg in 2 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

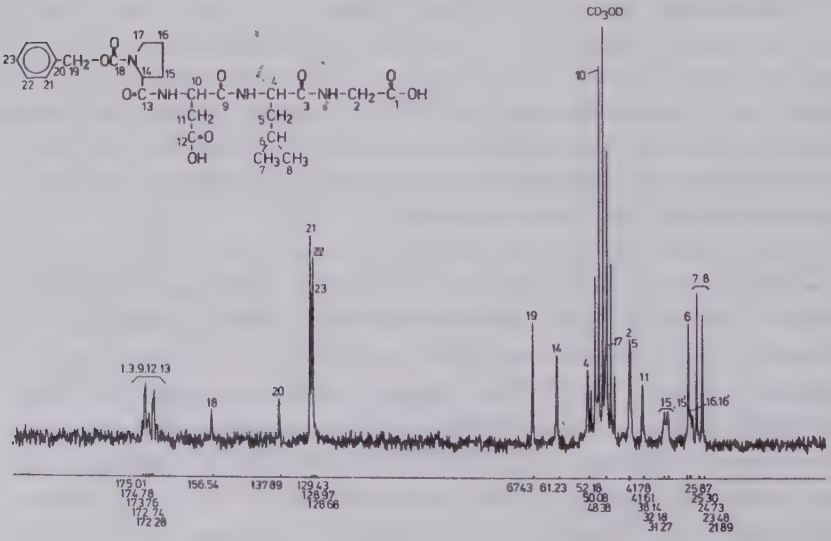
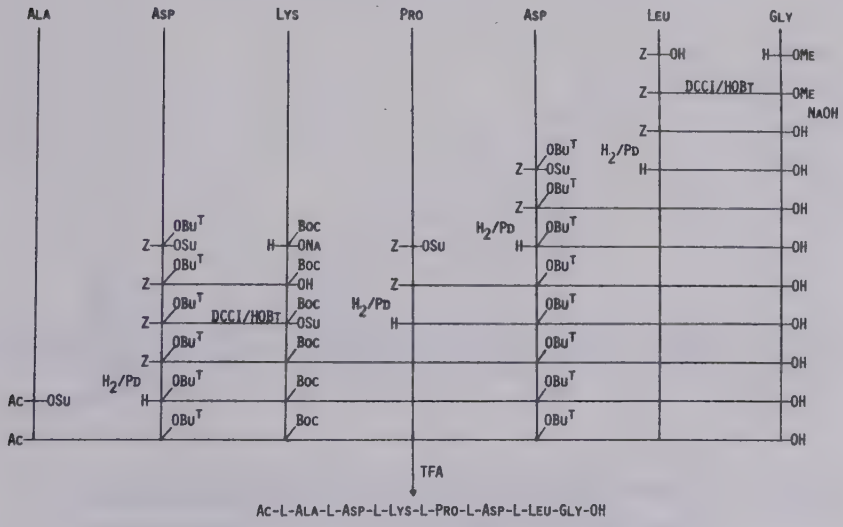


Abb. 14: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Pro-Asp(OH)-Leu-Gly-OH, 200 mg in 2 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt.

siert. Hier umgesetztes Ausgangsprodukt wird mit Ether extrahiert (1.8 g = 8 %). Nach Ansäuern mit H_3PO_4 wird mit Essigester extrahiert. Das Nebenprodukt kann durch Waschen mit Wasser aus der organischen Phase entfernt werden. Nach der Aufarbeitung wird eindeutig bewiesen, daß es sich bei dem Nebenprodukt um Z-Pro-Asp(OH)-Leu-Gly-OH handelt (24.3 %). Der tert.-Butylester wird also in beträchtlichem Maße verseift. Das gewünschte Z-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OH wird nur in 58.3 %iger Ausbeute erhalten.

Da die Verseifung des Methylesters nicht in genügenden Mengen zu einem einheitlichen Produkt führt, wird für das Thymosin $ß_9$ (1-7) mit freier Carboxylgruppe ein neuer Syntheseweg beschritten.



Syntheseschema 2: Darstellung von Thymosin $ß_9$ (1-7)

Es wird wie in Syntheseschema 1 vom einfach darzustellenden und gut zu reinigenden Dipeptid Z-Leu-Gly-OMe ausgegangen. Die Verseifung kann hier gefahrlos erfolgen und führt zum sehr gut kristallisierenden Z-Leu-Gly-OH.

Um einer Zyklisierung des freien Dipeptids H-Leu-Gly-OH zum Diketopiperazin während der Hydrierung vorzubeugen, wird mit 1N HCl versetzt. Das entstandene Hydrochlorid wird möglichst schnell mit Z-Asp(OBu^t)-OSu zum sehr gut kristallisierenden Z-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OH mit hoher Ausbeute umgesetzt.

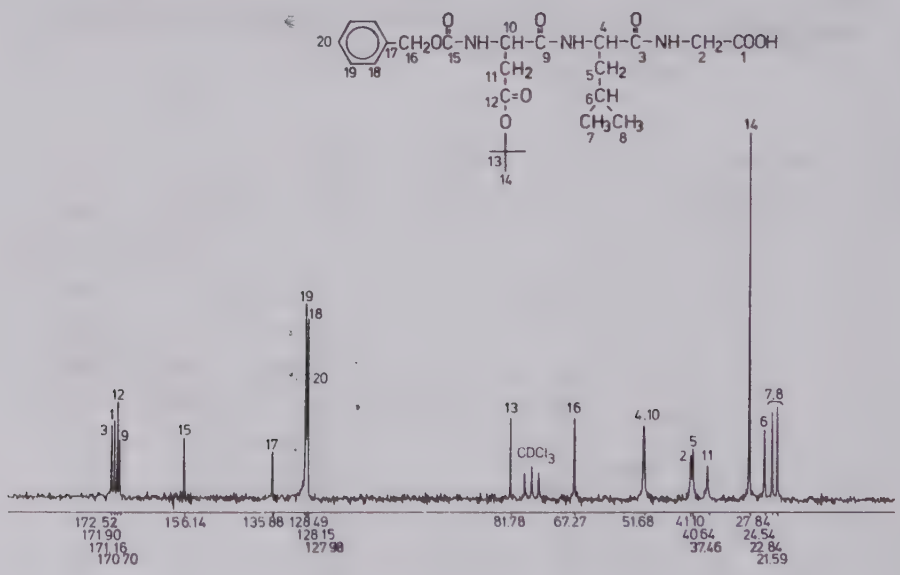


Abb. 15: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OH, 210 mg in 2 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

Die Entacylierung in Methanol unter Zusatz von Essigsäure ergibt quantitativ das dünnschichtchromatographisch einheitliche und gut charakterisierbare Acetat von H-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OH. Nach einiger Zeit stellt man jedoch durch Vergleich der Elementaranalysen eine Abnahme des Acetatgehaltes fest. Die Substanz gibt also bei der Lagerung Essigsäure ab. Eine vollständige Entfernung durch längeres Trocknen im Hochvakuum gelingt aber nicht.

Die Aktivesterkupplung mit Z-Pro-OSu verläuft nicht befriedigend. Es entstehen zwei Produkte mit fast identischem Rf-Wert, wobei durch Vergleich mit dem durch Verseifen syn-

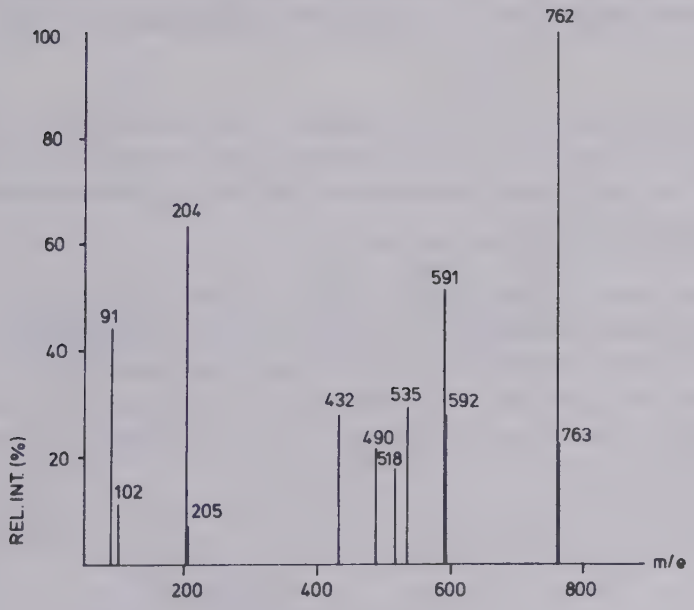


Abb. 16: FD-MS-Spektrum von Z-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OH, Temperatur 50° C, Lösungsmittel $CHCl_3$

Interpretation der wichtigsten Fragmentionen:

m/e	Fragmention
762	2 x ($^{\oplus}$Pro-Asp(C≡O$^{\oplus}$)-Leu-Gly-COO$^{\ominus}$)
591	$(M + H)^+$
535	M^+ - Isobutylen
518	M^+ - Gly
490	518 - CO
204	Z-Pro$^+$
91	$C_7H_7^+$

thetisierten Z-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OH und Aminosäurenanalyse der untere Fleck als gesuchte Substanz identifiziert werden kann. Das Nebenprodukt konnte bis jetzt noch nicht charakterisiert werden. Nach mehrmaliger Kristallisation aus EE/Ether erhält man das gesuchte Tetrapeptid in reiner Form.

Das Massenspektrum von Z-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OH zeigt eine Besonderheit. Man findet eine Fragmention, welches sich als Dimeres des von allen Schutzgruppen befreiten Tetrapeptids interpretieren läßt.

Die Freisetzung der Aminofunktion mit H_2/Pd(10 %)/C muß in Methanol/Wasser erfolgen, da die entstehende Verbindung in Methanol schwer löslich ist. Das N- und C-terminalfreie und aus Wasser/Methanol gut kristallisierende Tetrapeptid H-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OH wird in beinahe quantitativer Ausbeute erhalten.

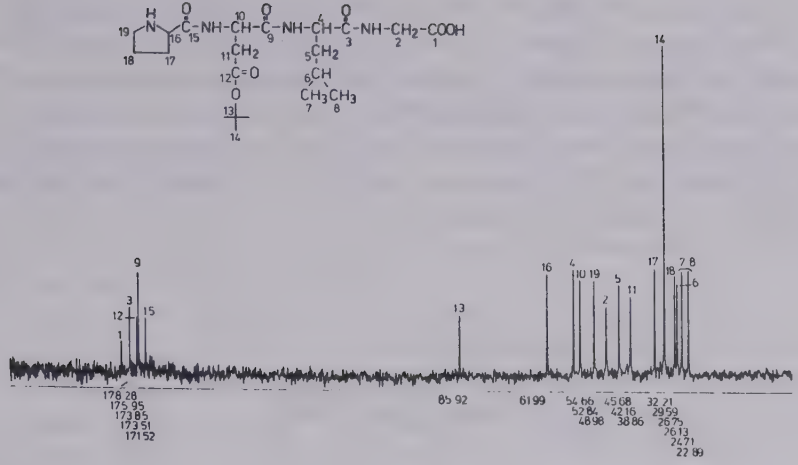


Abb. 17: ^{13}C-NMR-Spektrum von H-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OH, 190 mg in 2 ml D_2O, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

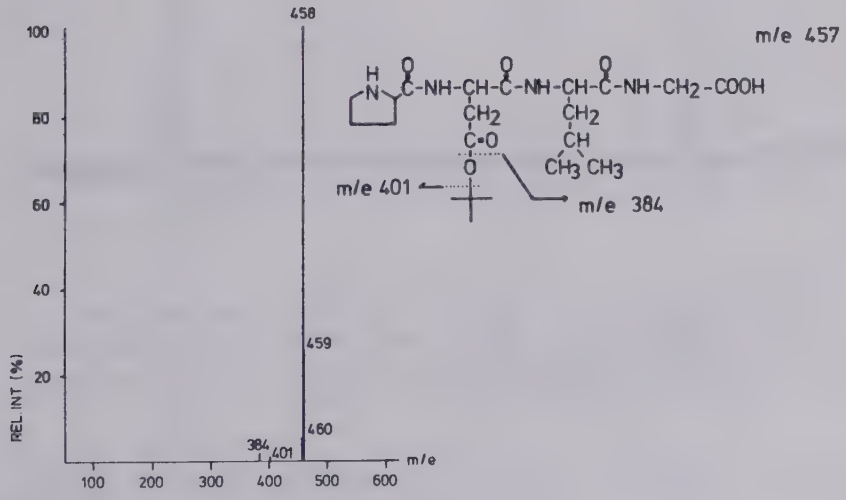


Abb. 18: FD-MS-Spektrum von H-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OH, Temperatur 50° C, Lösungsmittel H_2O

Aus den schon in IV.2.1. besprochenen Gründen erfolgt als nächster Schritt eine (2 + 4)-Kupplung. Da nun aber eine freie Carboxylgruppe vorhanden ist, wird zur Synthese von Z-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OH das analog Syntheseschema 1 dargestellte Dipeptid Z-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OH mit DCCI und Hydroxysuccinimid in den kristallin erhältlichen Aktivester überführt.

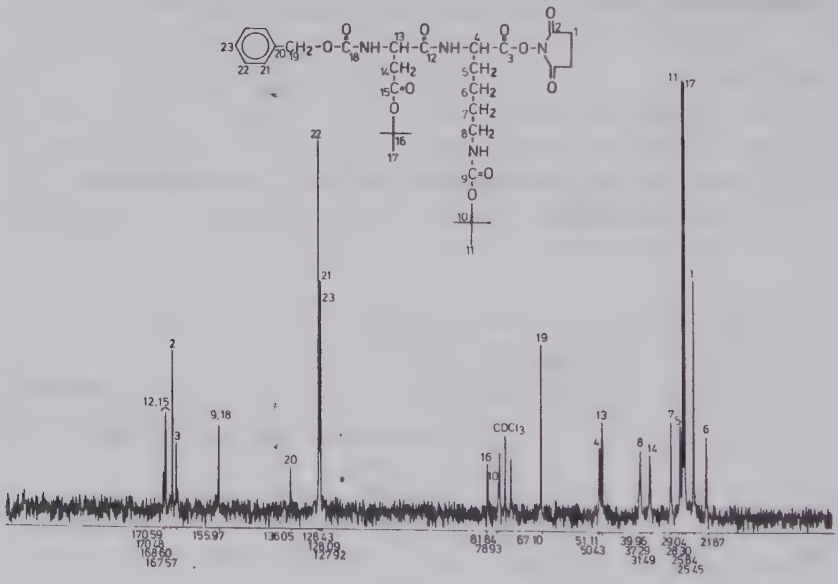


Abb. 19: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OSu, 200 mg in 2 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

Nach üblicher Entfernung der Aminoschutzgruppe mit Wasserstoff wird kein einheitliches Produkt erhalten. Durch mehrmaliges Waschen mit 1 %iger $NaHCO_3$-Lösung sowie Reextraktion mit Essigester bzw. n-Butanol können die Verunreinigungen abgetrennt werden. Die Aminosäurenanalyse ergab für das Hauptnebenprodukt, daß es sich um H-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OH handelt. Da das Z-geschätzte Hexapeptid nicht kristallisiert werden konnte, stammt die Verunreinigung von nicht umgesetztem Z-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OSu. Durch Verlängerung der Reaktionszeit kann eine fast vollständige Umsetzung erreicht werden. Das entacylierte Hexapeptid H-Asp(OBu^t)-Lys-(Boc)-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OH wird mit Ac-Ala-OSu zum geschützten Thymosin $ß_9$ (1-7) weitergekuppelt. Nach mehrmaliger Kristallisation aus Essigester erhält man das Peptid in chromatographisch reiner Form.

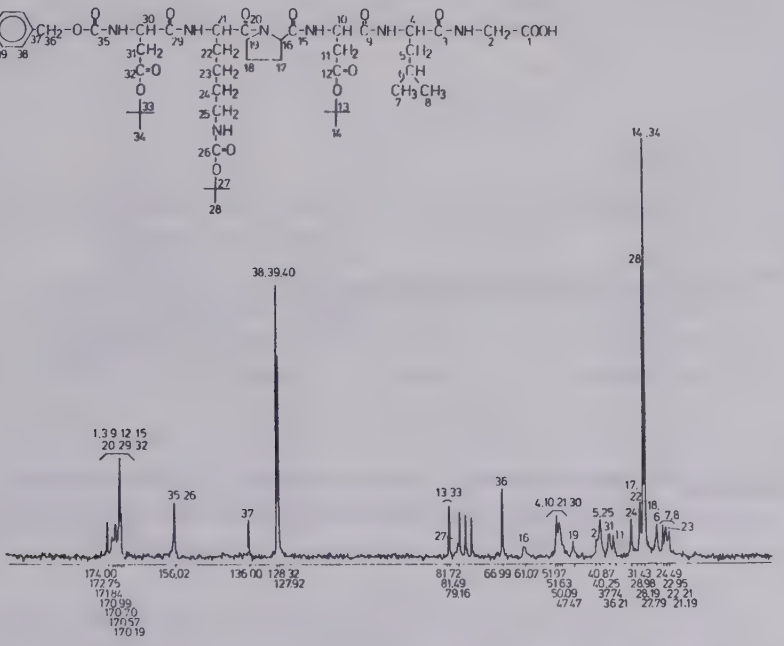


Abb. 20: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp-(OBu^t)-Leu-Gly-OH, 190 mg in 1.5 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

Die Freisetzung mit TFA erfolgt analog Syntheseweg 1. Die so erhaltene Substanz zeigt in mehreren Laufmittelsystemen identisches Verhalten im Vergleich mit dem nach Syntheseschema 1 dargestellten Heptapeptid. Die Aminosäurenanalyse entspricht den theoretischen Werten.

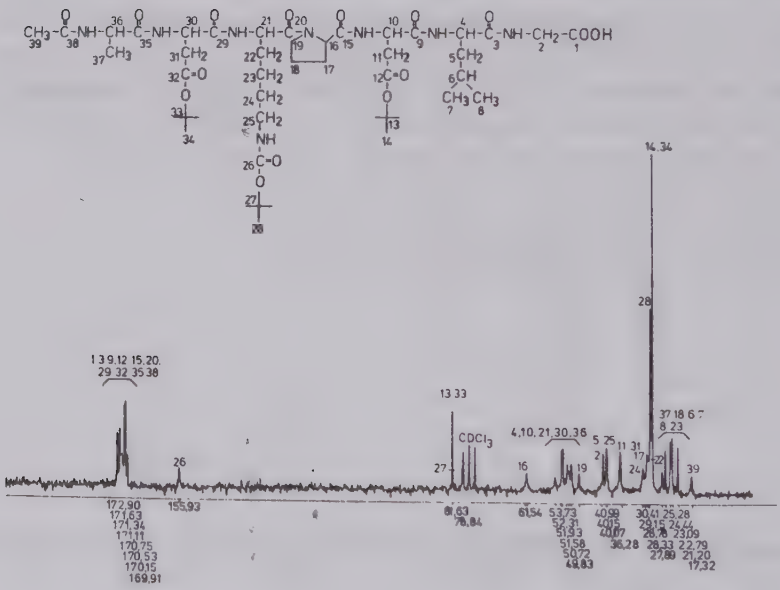


Abb. 21: ^{13}C-NMR-Spektrum von Ac-Ala-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OH, 180 mg in 1.5 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

IV.2.4. Syntheseweg 3

IV.2.4.1. Konzept der differenzierten Säurehydrolyse

Wie in den beiden vorangegangenen Synthesen beschrieben, verläuft die hydrogenolytische Entfernung der Carbobenzoxygruppe von Z-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe bzw. freier Carboxylgruppe nicht einheitlich. Es entstehen Nebenprodukte, welche nur unter beträchtlichen Ausbeuteverlusten entfernt werden können.

Um das Konzept beibehalten zu können, die konstanten Schutzgruppen unter schonender Säurehydrolyse abzuspalten, wird hier eine neu entwickelte, extrem säurelabile Aminoschutzgruppe verwendet. Sie soll auf der Stufe des Hexapeptids, bei gleichzeitiger Anwesenheit von drei ebenfalls leicht acidolytisch abspaltbaren Resten, auf ihre Verwendbarkeit getestet werden.

IV.2.4.2. Überlegungen zur Synthese säurelabiler Schutzgruppen

Wie die Entwicklung in den letzten Jahren zeigt, können durch einfache Variationen von bekannten Schutzgruppen des Urethantyps extrem säurelabile Verbindungen entwickelt werden. Hauptsächlich durch Einführung einer α,α-Dimethylgruppe in Reste vom Z-Typ. Bei der Boc-Gruppe durch Ersatz von H-Atomen oder CH_3-Gruppen durch Phenylreste. Die Wirkung wird durch Verwendung von substituierten Phenylresten erheblich vergrößert.

Als Beispiele sind zu nennen: die Ddz(α,α-Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl)-[286], Bpoc(2-(p-Biphenylyl)-isopropyloxycarbonyl)-[287], Adpoc(1(1-Adamantyl)-1-methyl-ethoxycarbonyl)-[288,289], Ppoc (Phenylisopropyloxycarbonyl)-[290], Azoc(p-Phenylazophenyl)-isopropyloxycarbonyl)-[291]

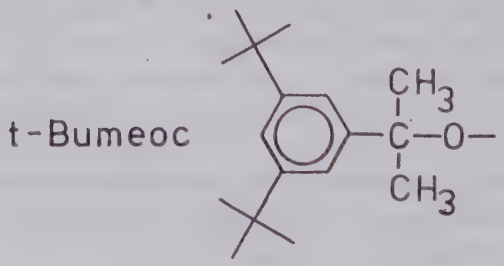
und Bzpoc(1-Benzyl-1-methylethoxycarbonyl)-Gruppe[292].

Mit der Einführung dieser Verbindungen zum intermediären Schutz der Aminofunktion konnte aber die Selektivität der Abspaltung, vor allem bei Anwesenheit einer N^{ε} -Boc-Gruppe am Lysin, noch nicht befriedigend gesteigert werden.

IV.2.4.3. Die 1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl(t-Bumeoc)-Gruppe

In Anlehnung an die schon bekannten säurelabilen Gruppen mit einer α,α-Dimethylfunktion, welche als Grundvoraussetzung für eine große acidolytische Labilität angesehen werden kann, werden die Substituenten am Phenylrest variiert.

Unter der Annahme, daß die saure Spaltung als monomolekulare Reaktion unter Alkyl-Sauerstoff-Spaltung erfolgt, wird die Reaktion umso schneller verlaufen, je stabiler das entstehende Carbeniumion ist.
Die so erhaltene



1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl(t-Bumeoc)-Gruppe zeigt folgende Eigenschaften:

- Die Einführung der Schutzgruppe gelingt in guten Ausbeuten mit dem Fluorameisensäureester (t-Bumeoc-F). Er konnte bis jetzt nur als relativ leicht zersetzliches Öl gewonnen werden. t-Bumeoc-F ist aber in Lösung bei -18° C (Tiefkühlschrank) über längere Zeit haltbar.
- Die Abspaltung der t-Bumeoc-Gruppe gelingt schnell und mild mit 3 % TFA in Methylenchlorid innerhalb weniger Minuten, teilweise sogar Sekunden, bzw. mit 80 %iger Essigsäure oder Essigsäure/83 Gew.-% Ameisensäure/Wasser (7:1:2) innerhalb von 2 Stunden bzw. 20 Minuten. Im Molekül vorhandene N^{ε}-Boc-, tert.-Butylester- oder tert.-Butylethergruppierungen bleiben vollständig erhalten.
- Die Schutzgruppe ist gegen Alkali und Hydrogenolyse stabil. Man beobachtet jedoch bei Durchführung der Reaktion im sauren Milieu in Anwesenheit eines Pd-Katalysators eine partielle Zersetzung.
- Durch die starke Lipophilie besitzt der Rest extreme lösungsvermittelnde Eigenschaften. So können z.B. t-Bumeoc-geschützte Aminosäuren aus n-Hexan umkristallisiert werden.
- Die geschützten Aminosäuren sind bei normalen Lichtverhältnissen stabil. Einige Derivate müssen als DCHA-Salze aufbewahrt werden, da sie im festen Zustand im Kühlschrank analog zur Bpoc-Gruppe[287] zu autokatalytischer Zersetzung neigen.

IV.2.4.4. Synthese der Ausgangsverbindungen und Einführungsreagenzien

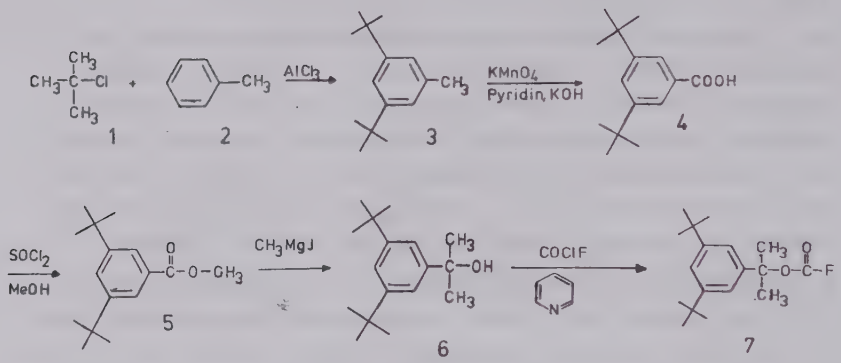


Abb. 22: Syntheseschema zur Darstellung von 2-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-2-propanol (6)

Da die Ausgangsverbindungen nicht käuflich erwerbbar sind, mußte zuerst ein einfacher Weg zu ihrer Synthese entwikkelt werden. Die als Ausgangsverbindung dienende 3,5-Di-tert.-butylbenzoesäure (4) wird durch eine Friedel-Crafts-Reaktion von tert.-Butylchlorid (1) mit Toluol (2) über 3,5-Di-tert.-butyltoluol (3) und anschließende Oxidation der Methylgruppe mit Kaliumpermanganat dargestellt. Durch Umsetzung des Methylesters (5) mit Methylmagnesiumiodid (Grignard-Reaktion) wird 2-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-2-propanol (6) erhalten.

Die Einführung der Schutzgruppe erfolgt mit dem Fluorameisensäureester (8). Das Phenylcarbonat des t-Bumeoc-Restes (9) ist instabil und eignet sich bedingt als Einführungsreagenz. Es zersetzt sich beim Umkristallisieren. Der entsprechende p-Nitrophenylester (10) zerfällt bei Raumtemperatur schon in Lösung.

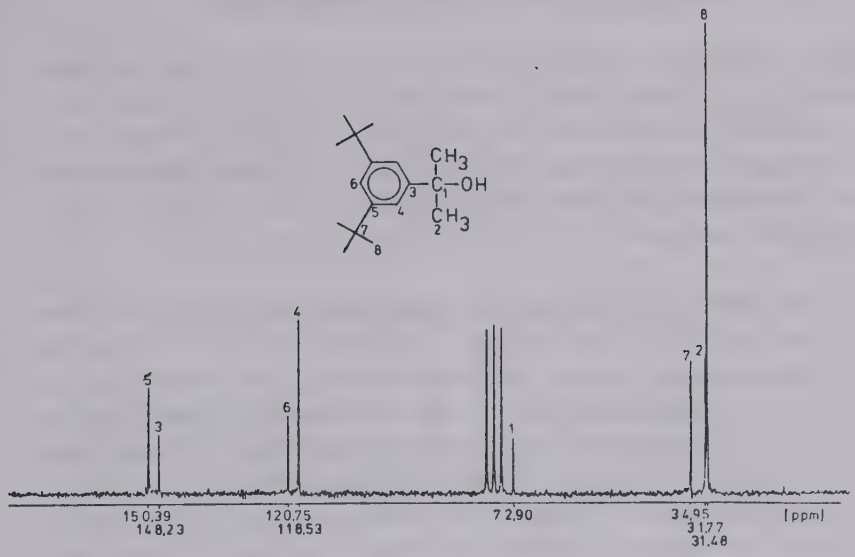


Abb. 23: ^{13}C-NMR-Spektrum von 2-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-2-propanol, 200 mg in 1.5 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

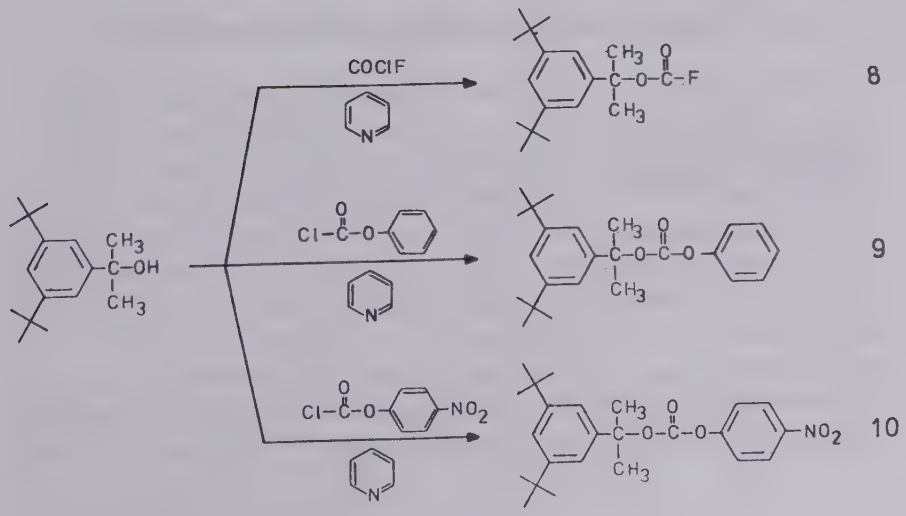


Abb. 24: Reagenzien zur Einführung des t-Bumeoc-Restes

IV.2.4.5. Darstellung von t-Bumeoc-Aminosäuren

Die Einführung gelingt sowohl über die Benzyltrimethylammoniumsalze in organischen Lösungsmitteln, als auch in wässrig/organischer Lösung mit und ohne pH-Kontrolle (pH-Stat) bei 0° C in guten Ausbeuten. Der Umsetzung in wässrigem Milieu wird der Vorzug gegeben, da die Acylierung schneller und einfacher verläuft.

Die dargestellten geschützten Aminosäuren und ihre physikalischen Werte sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die synthetisierten Verbindungen zeigen eine extrem hohe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln. So ist zum Beispiel sogar das Na-Salz der mit t-Bumeoc geschützten Aminosäure in Ether, teilweise sogar in n-Hexan löslich. Größere Verluste bei der Darstellung können vermieden werden, wenn nach der Verteilung der alkalischen Reaktionsmischung zwischen Ether und Wasser die organische Phase mehrmals mit Wasser oder 1 %iger $NaHCO_3$-Lösung extrahiert wird. Zum Teil sind die geschützten Aminosäuren aus Petrolether umkristallisierbar.

IV.2.4.6. ^{13}C-NMR-Spektroskopie der t-Bumeoc-Aminosäuren

Die ^{13}C-NMR-Spektroskopie gehört heute zu den wichtigsten Methoden zur Strukturidentifizierung. Die Zuordnung erfolgt nach bestimmten Regeln und durch Vergleich mit abgeleiteten Verbindungen[293,294]. Charakteristisch für alle Spektren von t-Bumeoc-Aminosäuren sind die beiden Signale der tert.-Butylgruppen im aliphatischen Bereich bei 31.4 ppm bzw. 34.8 ppm. Die Lage dieser beiden Signale ist bis auf $\pm$ 0.1 ppm in allen Verbindungen identisch. Die Resonanzen der α,α-Dimethylgruppe erscheinen im gleichen Bereich wie die Boc-Gruppe. Das quartäre C-Atom ist erwartungsgemäß gegenüber dem Boc-Rest zu tieferem Feld verschoben[295] (siehe Tabelle 2).

Tab. 1: t-Bumeoc-Aminosäuren

t-Bumeoc-Derivat von	%Ausb.	Schmp. °C (Umkrist.aus)	$[\alpha]_D$	pH[a]	Rf(D)[b]	Summenformel (Molmasse)		C	H	N
Ala	83	112-114 (EE/PE)	-10.15 (c=1.06,MeOH)	9.8	0.52	$C_{21}H_{33}NO_4$ (363.5)	Ber.	96.40	9,15	3.85
							Gef.	69.56	9.32	3.87
Asp(OBu^t)	91	136 (Ether/PE)	-6.2 (c=1.01,MeOH)	9.8	0.57	$C_{26}H_{41}NO_6$ (463.6)	Ber.	67.36	8.91	3.02
							Gef.	67.54	9.06	3.04
Gln	65	97-108 (Zers.) (EE/Ether/PE)	-7.0 (c=1.01,MeOH)	9.5	0.31	$C_{23}H_{36}N_2O_5$ (420.6)	Ber.	65.69	8.63	6.66
							Gef.	64.48	8.68	6.29
Gly-OEt	64	117-118 (PE)	---		0.77	$C_{22}H_{35}NO_4$ (377.5)	Ber.	69.99	9.34	3.71
							Gef.	69.91	9.50	3.65
Leu.DCHA	65	113-118 (Zers.) (PE)	-14.4 (c=1.00,MeOH)	9.8	0.63	$C_{36}H_{62}N_2O_4$ (586.9)	Ber.	73.76	10.65	4.77
							Gef.	74.04	10.67	4.63
N$^\varepsilon$-Boc-Lys.DCHA	87	71-74 (PE)	+7.3 (c=1.00,MeOH)		0.53	$C_{41}H_{71}N_3O_6$ (702.0)	Ber.	70.14	10.19	5.98
							Gef.	70.61	10.50	5.85
Ser(Bu^t).DCHA	72	70-85 (Zers.) (PE)	+16.2 (c=1.00,MeOH)		0.48	$C_{37}H_{64}N_2O_5$ (616.9)	Ber.	72.04	10.46	4.54
							Gef.	71.77	10.69	4.49
Trp.DCHA	84	194 (Zers.) (Ether(PE)	+17.8 (c=1.00,MeOH)		0.58	$C_{41}H_{61}N_3O_4$ (660.0)	Ber.	74.62	9.32	6.37
							Gef.	74.63	9.64	6.30
Phe	70	115-117 (EE/PE)	+16.31 (c=1.01,MeOH)	10.2	0.57	$C_{27}H_{37}NO_4$ (439.6)	Ber.	73.77	8.48	3.18
							Gef.	74.04	8.54	3.19
Val.DCHA	76	128-138 (Zers.) (PE)	-9.8 (c=1.03,MeOH)		0.50	$C_{35}H_{60}N_2O_4$ (572.9)	Ber.	73.38	10.56	4.89
							Gef.	73.04	10.82	4.89

a) Reaktionen an einem pH-Stat-Gerät. - b) D: MeOH/Benzol/$CHCl_3$/H_2O (40:40:40:5)

Tab. 2: ^{13}C-NMR-Verschiebungen (δ-Werte bezüglich TMS, Solvens: $CDCL_3$) einiger t-Bumeoc-Aminosäuren

Derivat	CO_2H	C_α	C_β	C_γ	C_δ	C=O	C_q	CH_3	1	2	3	4	5	6
t-Bumeoc-OH							72.90	31.77	148.23	118.53	150.39	120.75	34.95	31.48
tBumeoc-Ala-OH	178.00	49.23	18.61			154.84	82.39	29.04	145.08	118.35	150.30	120.89	34.86	31.47
t-Bumeoc-Asp (OBu^t)-OH	177.42	52.54	39.17	172.81		155.40	81.67	28.01	145.90	118.36	150.11	120.52	34.84	31.48
	OBu^t: 81.27, 28.01													
t-Bumeoc-Gln-OH	176.83	52.82	29.68	31.44	174.8	155.38	82.26	28.71	145.11	118.34	150.31	120.81	34.82	31.44
t-Bumeoc-Gly-OEt	170.24	42.56				155.03	82.21	29.04	145.26	118.47	150.18	120.89	34.92	31.47
	OEt: 61.24, 14.13													
t-Bumeoc-Leu-OH.DCHA[a]	177.27	54.75	43.59	24.86	22.68 23.22	154.84	81.00	29.53	146.11	118.47	150.05	120.53	34.86	31.53
t-Bumeoc-Lys (Boc)-OH.DCHA[b]	176.34	55.38	30.40	22.55	33.59	154.83	80.87	29.72	145.95	118.36	149.99	120.69	34.78	31.48
	n-Boc: 155.91, 78.82, 28.36													
t-Bumeoc-Phe-OH	176.73	54.26	37.89			154.78	82.45	28.98	145.08	118.41	150.30	120.95	34.92	31.53
	C_{arom}: 135.81, 129.38, 128.65, 127.14													
t-Bumeoc-Ser (Bu^t)-OH.DCHA[c]	174.57	56.23	63.12			154.83	80.81	29.21	146.07	118.47	149.94	120.52	34.78	31.43
	t-Bu: 72.28, 27.50													
t-Bumeoc-Trp-OH.DCHA[d]	178.94	45.21	29.77			156.76	82.36	30.11	147.31	119.43	151.41	121.43	35.69	31.37
	C_{arom}: 137.94, 129.56, 124.33 122.05, 119.83, 112.09													
t-Bumeoc-Val-OH.DCHA[e]	175.90	60.74	31.98	19.59		155.04	80.69	29.20	145.83	118.26	149.87	120.48	34.77	31.37

[a] DCHA-Signale: 52.87, 29.53, 24.86, 25.22. - [b] DCHA-Signale: 52.54, 29.27, 24.71, 25.17. - [c] DCHA-Signale: 52.43, 28.97, 24.74, 25.00. - [d] DCHA-Signale: 51.11, 30.62, 25.50, 26.13. - [e] DCHA-Signale: 52.50, 29.20, 24.77, 25.16.

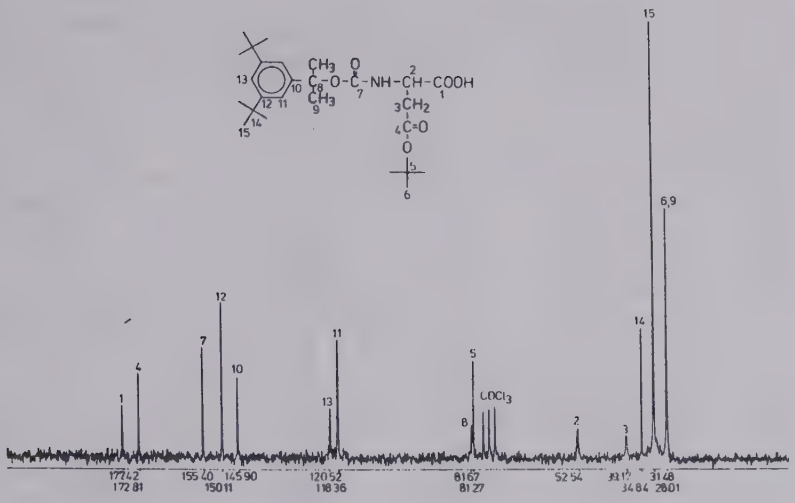


Abb. 25: ^{13}C-NMR-Spektrum von t-Bumeoc-Asp(OBu^t)-OH, 230 mg in 2 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

IV.2.4.7. Bestimmung der Abspaltungsgeschwindigkeit

Von größerem Interesse für die Peptidsynthese dürfte die t-Bumeoc-Gruppe deshalb sein, da sie sehr leicht mit 3 % Trifluoressigsäure in Methylenchlorid, einem Gemisch aus Essigsäure/83 Gew.-% Ameisensäure/Wasser (7:1:2, v/v) oder 80 %iger Essigsäure abgespalten werden kann. In diesen drei Lösungsmittelgemischen wurde die Abspaltungskinetik untersucht (s. Experimenteller Teil).

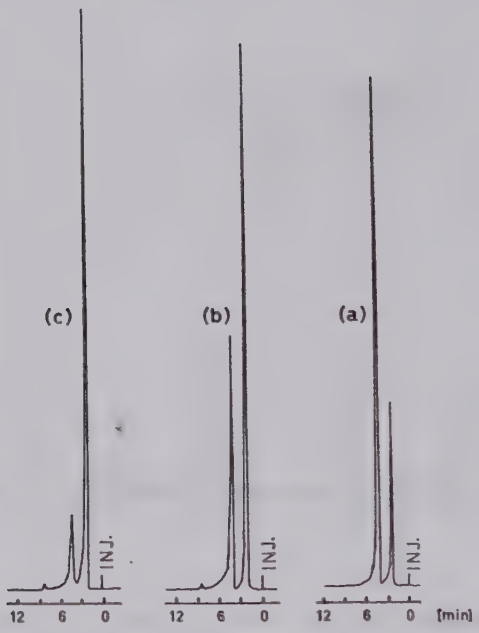


Abb. 26: HPLC-Diagramm von t-Bumeoc-Trp-OH nach Behandeln mit Essigsäure/83 Gew.-% Ameisensäure/Wasser (7:1:2, v/v) bei Raumtemperatur.
Bedingungen: RP-18-Säule (25 x 4 cm, 5 μ Partikeldurchmesser); Druck: 210 bar; Durchflußrate: 1 ml/min; mobile Phase: 85 % MeOH, 15 % 0.01 M Ammoniumacetatlösung; pH= 5.1; isokratische Bedingungen; Injektion 10 µl; Detektion bei 254 nm

Der Anteil an freigesetztem H-Trp-OH beträgt nach 1 min 21 % (a), nach 5 min 64.1 % (b) und 15 min 84.4 % (c). Der freie Alkohol zeigt nach Vergleich fast übereinstimmende Rf-Werte wie das freie Tryptophan. Der bei t_R = 8.4 auftretende Peak entspricht der nach Abspaltung von Wasser aus 2-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-2-propanol entstehenden ungesättigten Verbindung 2-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-2-propen.

Verbindung	System	50 % Spaltung [min]	99,9 % Spaltung [min]	k_1 [min^{-1}]
t-Bumeoc-	a	0.07	0.58	8.0
Ala-OH	c	1.5	12.5	0.35
	b	15.0	105.0	0.046
t-Bumeoc-	a	0.07	0.62	9.0
Phe-OH	c	2.1	18.8	0.19
	b	22.0	167.0	0.03
t-Bumeoc-	a	0.07	0.41	11.3
Trp-OH	c	3.3	24.2	0.19
	b	14.0	98.3	0.046
t-Bumeoc-	c	1.8	16.5	0.25
Lys(Boc)-OH				
t-Bumeoc-Asp-	a	0.05	0.31	15.6
(OBu^t)-Lys(Boc)	c	7.25	45.4	0.1
Pro-Asp(OBu^t)-	b	27.2	190.8	0.024
Leu-Gly-OMe				

a: 3 % Trifluoressigsäure in Methylenchlorid
b: 80 %ige Essigsäure
c: Essigsäure/83 Gew.-% Ameisensäure/Wasser (7:1:2)

Tab. 3: Spaltungsgeschwindigkeit von t-Bumeoc-Aminosäuren

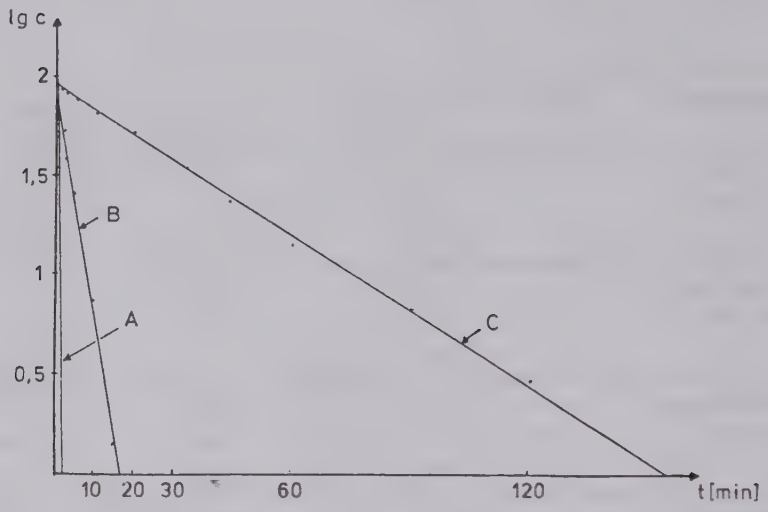


Abb. 27: lg c/t-Diagramm von t-Bumeoc-Phe-OH
A: 3 % Trifluoressigsäure in Methylenchlorid
B: 80 % Essigsäure
C: Essigsäure/83 Gew.-% Ameisensäure/Wasser (7:1:2)

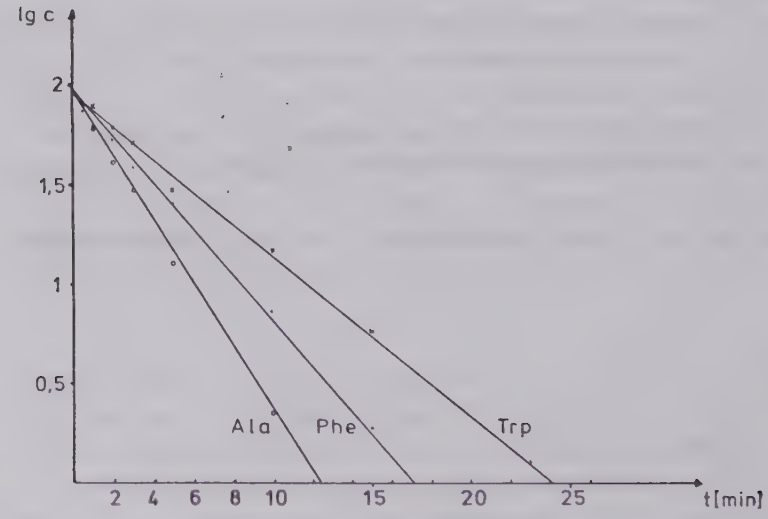


Abb. 28: lg c/t-Diagramm von verschiedenen t-Bumeoc-Aminosäuren in Essigsäure/83 Gew.-% Ameisensäure/Wasser (7:1:2)

Schutzgruppe	k_1 a) $[h^{-1}]$	k_{rel}	k_1 b) $[h^{-1}]$	k_{rel}
Boc	$5.0\ 10^{-4}$	1	$2.0\ 10^{-3}$	1
Ppoc	0.35	700	1.5	750
Adpoc	1.2 c)	2400	1.2	600
Bpoc	1.4	2800	3.9	2000
t-Bumeoc d)	2.0	4000	16.0	8000

a) In 80 %iger Essigsäure
b) In Essigsäure/83 Gew.-% Ameisensäure/Wasser (7:1:2)
c) Dieser Wert wurde bei 40° C bestimmt
d) Diese Werte gelten für das Phe-Derivat; andere geschützte Aminosäuren zeigen teilweise höhere Werte

Tab. 4: Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten bei verschiedenen Schutzgruppen

Die Auswertung zeigt, daß die Abspaltung durchwegs nach erster Ordnung verläuft. Neben anderen Abspaltungsprodukten konnten mittels HPLC der entsprechende Alkohol (in wässrigem Milieu), sowie das Olefin nachgewiesen werden, das sich durch Abgabe eines Protons aus dem Kation bilden kann. Die berechneten Geschwindigkeitskonstanten (s. Tab. 3) werden mit denen von Boc, Ppoc, Bpoc und Adpoc verglichen (s. Tab. 4). Es zeigt sich, daß nicht nur die Dissoziationskonstante der Säure, sondern auch die Natur des Abspaltungsmediums eine Rolle spielt.

Bei der Abspaltung des t-Bumeoc-Restes von N^{α}-t-Bumeoc (N^{ε}-Boc)Lysin, t-Bumeoc-Ser(Bu^t)-OH und t-Bumeoc-Asp(OBu^t)-OH läßt sich am Ende der Reaktion keine freie Aminosäure nachweisen. Die Abspaltung der Schutzgruppe von t-Bumeoc-Asp(OBu^t)Lys(Boc)-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe mit 3 % TFA/CH_2Cl_2 geschieht extrem

schnell (vgl. Tab. 3). Nach ca. 15 Minuten treten Nebenprodukte auf, d.h. die Reaktion muß rechtzeitig abgebrochen werden. Da die Reaktion nach 60 Sekunden beendet ist, gilt die Selektivität als gesichert. In den beiden anderen Systemen findet man längere Reaktionszeiten.

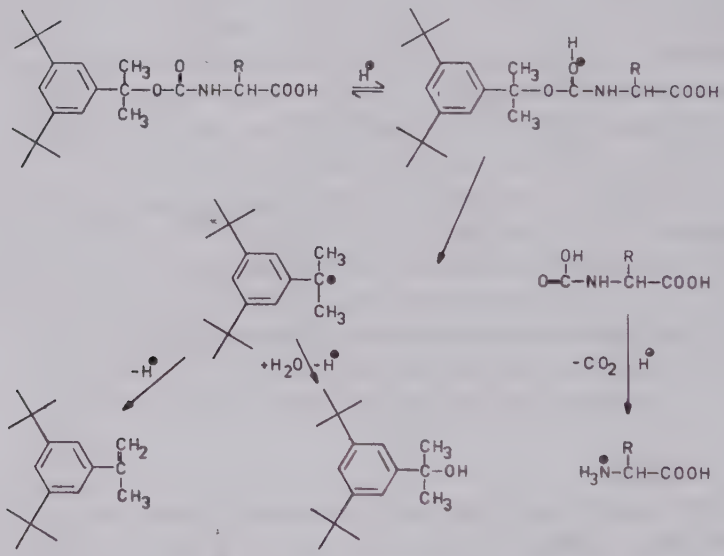


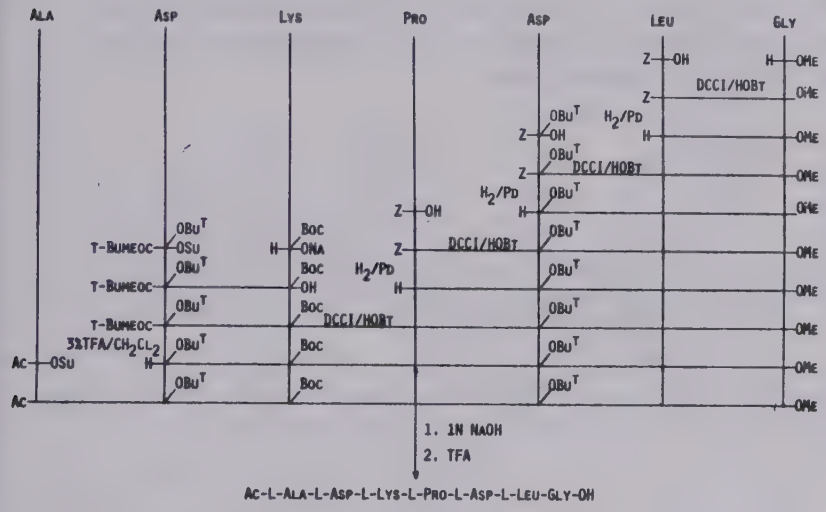
Abb. 29: Acidolyse der t-Bumeoc-Gruppe aus t-Bumeoc-Aminosäuren

In 80 %iger Essigsäure tritt nach etwa 85 %iger Abspaltung der t-Bumeoc-Gruppe ein Nebenprodukt auf. Am besten bewährt sich die Mischung aus Essigsäure/Ameisensäure/Wasser.

Der t-Bumeoc-Rest ist somit als α-Aminogruppenschutz neben anderen sauer abspaltbaren permanenten Schutzgruppen von trifunktionellen Aminosäuren besonders gut verwendbar. Erstmals eingesetzt wurde sie bei der Synthese des Molluscan Neuropeptides[296], um die Stabilität bei den üblichen Kupplungsbedingungen zu prüfen[269,297].

IV.2.4.8. Synthese des Thymosin β_9 (1-7) unter Verwendung der t-Bumeoc-Gruppe

Die Verbindung wird nach unten stehendem Syntheseschema dargestellt:



Syntheseschema 3: Darstellung von Thymosin β_9 (1-7)

Bis zur Stufe des Tetrapeptids Z-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe wird der gleiche Weg beschritten wie in Syntheseschema 1, da die Verwendung der t-Bumeoc-Gruppe bei dieser Sequenz keine Vorteile bietet. Die Hydrierung verläuft ohne Nebenreaktionen. Zur Darstellung des entsprechenden t-Bumeoc-Asp-(OBu^t)-OH wären zwei weitere Schritte notwendig. Erst bei der Abspaltung vom Hexapeptid t-Bumeoc-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe in Gegenwart von drei weiteren säurelabilen Schutzgruppen ist die Verwendung der t-Bumeoc-Gruppe vorteilhaft.

Die Synthese des Tetrapeptids Z-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe unter schrittweisem Aufbau von Z-Aminosäuren mit Hilfe der DCCI/HOBt-Kupplung und jeweiliger hydrogenolytischer Entfernung der α-Aminoschutzgruppe gelingt gut und mit hohen Ausbeuten. Für die anschließende (2 + 4)-Kupplung wird das Dipeptid t-Bumeoc-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OH synthetisiert, welches als DCHA-Salz kristallisierbar ist. Die Darstellung des für die Synthese notwendigen t-Bumeoc-Asp(OBu^t)-OSu gelingt ohne Probleme, ebenso wie die Verknüpfung mit dem Natriumsalz von H-Lys(Boc)-OH.

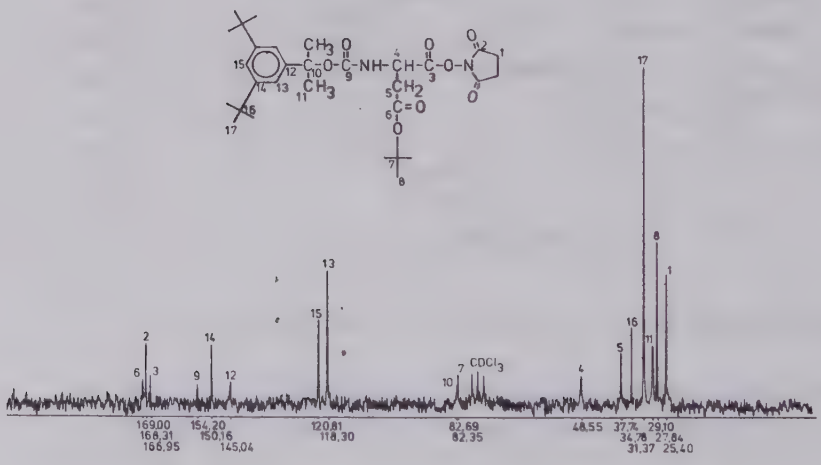


Abb. 30: ^{13}C-NMR-Spektrum von t-Bumeoc-Asp(OBu^t)-OSu; 200 mg in 2 ml $CDCl_3$; 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

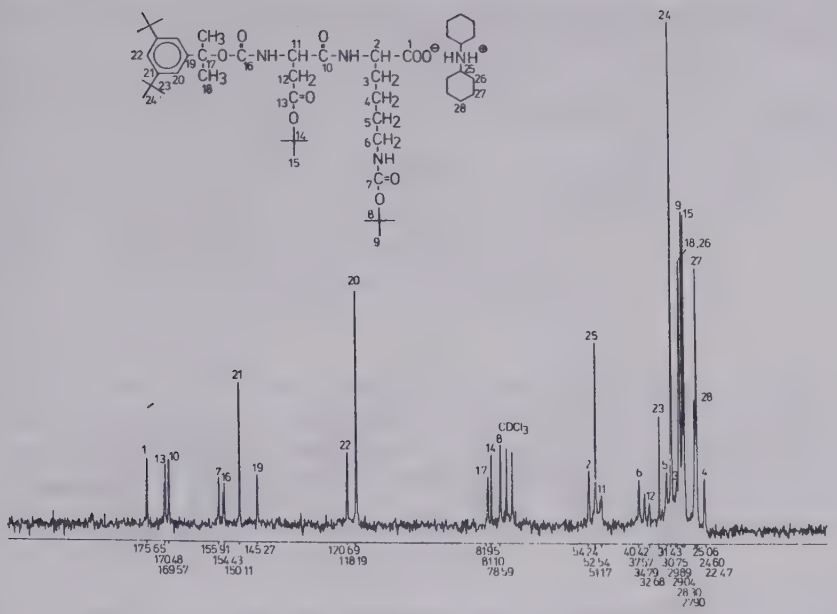


Abb. 31: ^{13}C-NMR-Spektrum von t-Bumeoc-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OH.DCHA, 200 mg in 2 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

Nach Entacylierung des Tetrapeptids zum H-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe wird das Dipeptid t-Bumeoc-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OH mit Hilfe der DCCI/HOBt-Methode zum t-Bumeoc-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe gekuppelt. Die Reaktion verläuft schnell und mit guten Ausbeuten.

Die Labilität der neuen t-Bumeoc-Schutzgruppe wird auch in den FD-MS-Spektren deutlich. Obwohl dies die schonendste Möglichkeit darstellt für hochmolekulare Moleküle im Massenspektrum einen Molekülpeak zu erhalten, ist dieser entweder sehr klein oder gar nicht vorhanden.

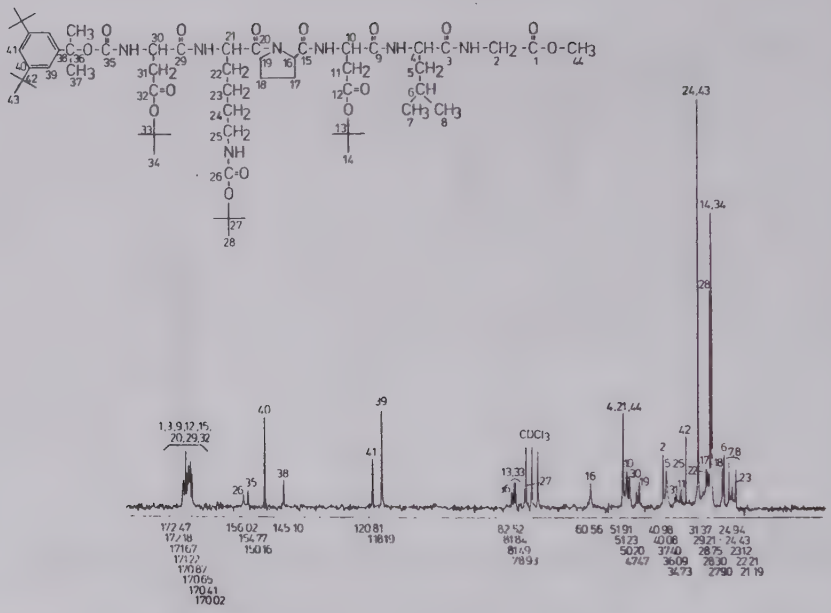


Abb. 32: ^{13}C-NMR-Spektrum von t-Bumeoc-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe, 190 mg in 1.5 ml $CDCl_3$, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

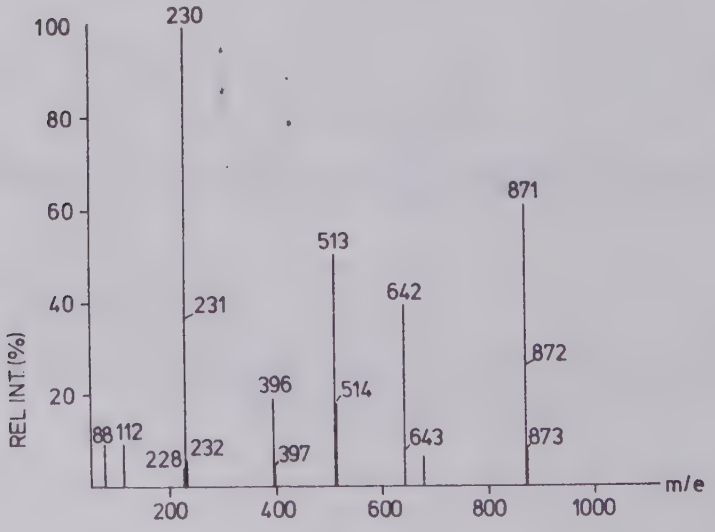


Abb. 33: FD-MS-Spektrum von t-Bumeoc-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe, Temperatur 50° C; Lösungsmittel $CHCl_3$

Interpretation der wichtigsten Fragmentionen

m/e	Fragmention
871	M^+ - t-Bumeoc
642	871 - Boc, - tert.-Butanol, - Isobutylen
513	871 - Leu-Gly-OMe, - Boc, - tert.-Butyl
396	$(H\text{-}Asp(C{=}O^+)\text{-}Lys\text{-}Pro\text{-}Asp(C{=}O))^+$
230	2-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-propen
88	$(H\text{-}Gly\text{-}OMe)^+$

Wie aus Abb. 33 zu entnehmen, wird trotz sehr vorsichtiger Temperaturerhöhung kein Molekülpeak gefunden. Die Massenpeaks mit den höchsten Intensitäten entsprechen dem Hexapeptidmethylester ohne Aminoschutzgruppe, sowie dem abgespaltenen Rest selber. Dies deutet darauf hin, daß sich das Peptid schon bei der Desorption zersetzt.

Eine weitere Besonderheit ist im FD-MS-Spektrum von t-Bumeoc-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OH.DCHA zu finden. An Stelle des erwarteten Molekülpeaks findet man ein Dimeres aus zwei von der t-Bumeoc-Gruppe befreiten Dipeptiden.DCHA. Der Peak für das DCHA-freie Peptid ist schwach. Die Peaks größter Intensität sind wieder dem Peptid mit freier N-terminaler Aminofunktion und dem aus der Schutzgruppe entstehenden 2-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-propen zuzuordnen.

Von einem Teil des t-Bumeoc-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe wird durch 5minütiges Behandeln mit 3 % TFA/CH_2Cl_2 die Aminogruppe freigesetzt. Analog zu Syntheseweg 1 wird mit Ac-Ala-OSu zum vollgeschützten Heptapeptid umgesetzt. Die Verbindung ist mit der nach Syntheseschema 1 dargestellten identisch.

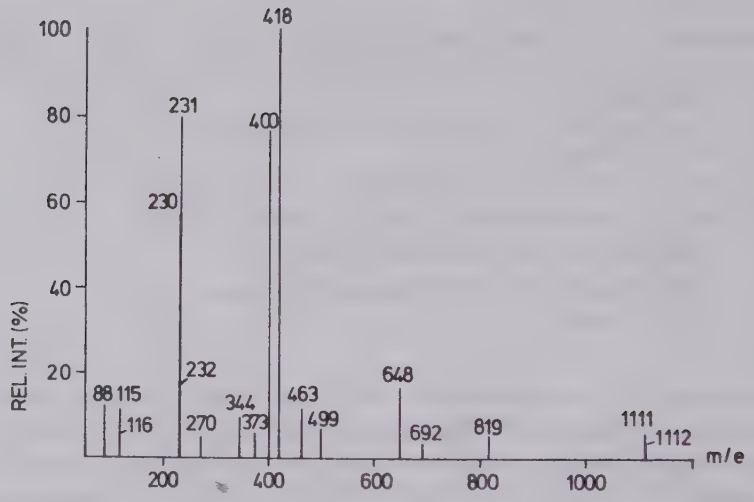


Abb. 34: FD-MS-Spektrum von t-Bumeoc-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OH.DCHA, Temperatur 50° C, Lösungsmittel $CHCl_3$

Interpretation der wichtigsten Fragmentionen:

m/e	Fragmention
1111	$[(Asp(OBu^t)\text{-}Lys(Boc)\text{-}OH)_2.DCHA]^+$
692	$(M + H)^+$ - DCHA
648	1111 - (Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OH)
463	M^+ - 2-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-propen
418	M^+ - t-Bumeoc
400	unbekannte Genese
373	418 - CO_2
230	2-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-2-propen
115	230 - 2xtert.-Butyl

IV.2.5. Biologische Aktivitätsuntersuchungen

Das Heptapeptid Thymosin $ß_9$ (1-7) wird bezüglich seiner Effekte auf die DNS-Syntheserate und die Proliferation von humanen Tumorzellen (Melanom, Wish, Seromed, München) und diploiden Fibroblasten (F.H.2: Biopsie-Zellen aus gesundem Kind; MRC-5: Seromed, München) in Zellkulturen getestet.

Diese Zellkulturen durchlaufen einen Testzyklus, der sich aus zwei Wachstumsphasen und einer Minimalphase zusammensetzt.

Wachstumsphase 1: Die in Ampullen eingeschmolzenen unter flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen werden möglichst rasch bei 37° C aufgetaut und in Kulturflaschen zusammen mit MEM-H-Medium (Instamed, Seromed, München) mit Zusätzen von Penicillin, Streptomycin, Neomycin und 10 % fötalem Kälberserum (FKS) bei 37° C inkubiert. Nach 2 Tagen werden die Zellen nach Trypsinisierung optisch gezählt und erneut eingesät (2×10^6-Zellen pro Flasche).

Wachstumsphase 2: Nach täglichem Mediumwechsel wird am 4. Tag wiederum die Zellzahl bestimmt und $0{,}5 \times 10^6$-Zellen/10 ml MEM + 10 % FKS in je 30 ml Kulturflasche eingesät.

Minimalphase: Nach 24 h wird das Medium abgesaugt und ein Minimalmedium mit reduziertem Serumzusatz (diploide Zellen: 1 %; heteroploide Zellen: 0.25 %) zugegeben.

Testphase: Nach 48 Stunden erfolgt die Präparatezugabe, wobei in den Versuchen 50 µl Präparat pro Flasche eingegeben werden. Für jede Präparateart und -konzentration werden pro Versuch drei Parallelproben angesetzt. Die Inkubation wurde bei Kurzzeit-Versuchen auf 8 h begrenzt. 4 h vor Ende dieser Wirkzeit werden jeweils 50 µl Methyl-^{3}H-Thymidin-Lösung (0.35 µCi) hinzupipettiert. Nach Ablauf der Wirkdauer wird das nicht eingebaute Thymidin durch viermaliges Waschen mit je 5 ml 2 %iger Perchlorsäure entfernt und die Zellen mit

1N HCl bei 70° C 1 h hydrolysiert. 0,5 ml dieses Hydrolysats wird in Scintillationsfläschchen überführt und mit 4,5 ml Cocktail (Biofluor™) gemischt. Die Aktivitätsmessung erfolgt in einem Beckmann LS-100 Liquid Scintillation Counter. Die relative Standardabweichung des gesamten Testsystems beträgt ± 10 %.

Für die Tumorversuche in vivo werden weibliche CBF_1(Balb/c ♀ x C57 ♂)-Mäuse verwendet. Sie stammen aus der Eigenzucht des Max-Planck-Institutes für Immunbiologie Freiburg und aus spezifisch pathogenfreier Haltung. Das Alter der Tiere beträgt 11 Wochen. Der Versuch wird mit 10 Tieren pro Gruppe durchgeführt.

Als Tumormodell wird ein Methylcholanthren induziertes Fibrosarkom (Meth.A.asc.) verwendet. Der Tumor wird wöchentlich durch intra-peritoneale Injektion von 1×10^6 Tumorzellen in diesen Tieren passagiert und 9 Tage nach Passage für die Transplantation benutzt.

Nach Entnahme aus dem Peritoneum und Aufarbeitung wird nach Anfärben mit Trypanblau unter dem Mikroskop ausgezählt. Es werden 7 % Trypanblau positive Zellen, das heißt tote Zellen, gefunden. Zum Setzen des Tumors werden 8.32×10^6 Tumorzellen/ml intracutan in die Bauchhaut gegeben.

Es wird nun der Einfluß von Thymosin β_9 (1-7) auf das Tumorvolumen (intracutanes Wachstum) des Meth.A.-Tumors untersucht. Das Tumorvolumen wird durch Messung zweier Durchmesser nach der Formel $V = \frac{2}{3} \pi ab \frac{a + b}{2}$ ermittelt. Am ersten, vierten und siebten Tag nach Inoculum werden pro Tier jeweils 1 mg Thymosin β_9 (1-7) in 0.5 ml PBS subcutan an zwei Stellen axillär injiziert. Das Tumorvolumen wird viermal nach Transplantation in Abständen von sieben Tagen bei allen 10 Tieren bestimmt.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

V.1. Spektroskopische Methoden

V.1.1. Kernresonanzspektroskopie

Die Aufnahme der PFT-^{13}C-NMR-Spektren erfolgt mit einem Bruker HFX-Multikerngerät (22.628 MHz) und einem WP-80-NMR-Spektrometer (20.115 MHz) ebenfalls von der Fa. Bruker, Karlsruhe. Die Spektren werden durch Akkumulation von ^{13}C-Impulsinterferogrammen (2-3.5 µs; 0.4 sec/scan) und anschließender Fouriertransformation (BNC-28-Rechner) des akkumulierten Interferogramms erhalten. Es werden ungefähr 200 - 300 mg der zu messenden Substanz in jeweils 1.0-2.0 ml des entsprechenden Lösungsmittels aufgelöst.

V.1.2. Massenspektrometrie

Die Felddesorptionsmassenspektren werden mit einem Gerät MAT 711 der Fa. Varian, Bremen, unter Verwendung einer FD-Ionenquelle gemessen. Die Temperaturen sind in den einzelnen Massenspektren angegeben.

V.1.3. Drehwerte

Die Drehwerte werden mit einem Zeiss OLD-5-Polarimeter bei 578, 546, 436, 405 und 365 nm gemessen. Die $[\alpha]_D$-Werte werden durch graphische Extrapolation ermittelt. Ein Teil der Drehwerte wird auf einem Perkin-Elmer 141 Polarimeter gemessen, wobei der $[\alpha]_D$-Wert direkt abgelesen werden kann.

V.2. Chromatographische Methoden

Alle dargestellten Verbindungen werden mittels Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von DC-Fertigplatten der Fa. Merck, Darmstadt (Kieselgel 60 F_{254}, auf Glas), sowie der Fa. Riedel de Haen, Seelze-Hannover (SI F, auf Aluminium) auf Einheitlichkeit überprüft. Folgende Fließmittelsysteme finden Verwendung:

A:	n-Butanol/Eisessig/Wasser	3:1:1
B:	n-Butanol/Eisessig/Wasser	2:1:1
C:	n-Butanol/Eisessig/Wasser (Oberphase)	4:1:5
D:	Chloroform/Methanol/Benzol/Wasser	8:8:8:1
E:	Chloroform/Methanol	95:5
F:	Chloroform/Methanol/25 % NH_3-Lösung	12:9:4
G:	n-Butanol/Eisessig/Pyridin/Wasser	5:1:5:4

Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgt unter Verwendung von Ninhydrinlösung[298] und Erwärmen auf 120° C, oder o-Toluidinlösung nach der Behandlung mit Chlor[298].

Die chromatographische Reinigung der Substanzen erfolgt auf Kieselgel-Fertigsäulen der Fa. Merck, Darmstadt (Lobar-Fertigsäule Größe A (240-10), LiChroprep Si 60, 40-63 µm). Als Mitteldruckpumpe wird das Modell A 2001 der Fa. CFG, Heidelberg, verwendet. Die Probenaufgabe erfolgt über ein Hochdruckinjektionssystem Modell 7125 der Fa. Rheodyn, Berkley, Californien. Es werden ein Fraktionssammler der Fa. LKB, Stockholm (Typ 2111 Multirac) und ein Fraktionssammler der Fa. Serva (Typ Linear II) benutzt. Des weiteren wird eine Glassäule K26/100 (100 x 2.6 cm, Vt = 530 ml) der Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden, gefüllt mit Sephadex G15 derselben Firma, verwendet. Für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie werden folgende Bauteile zu einer Einheit zusammengestellt: eine Pumpe BT 2030 und ein Photometer BT 3030 der Fa. Biotronik, Frankfurt und ein Hochdruckinjektionssystem, Modell 7120 der Fa. Rheodyn, Berkeley, Californien.

V.3. Sonstige Geräte

Die Schmelzpunkte werden auf einer Schmelzpunktsbestimmungsapparatur nach Dr. Tottoli (Typ Büchi 510) der Fa. Büchi, Flavil, Schweiz, gemessen und sind nicht korrigiert.

pH-Werte werden mit dem pH-Meter E 512 der Fa. Metrohm, Bad Herisau, Schweiz, gemessen. In Kombination mit dem Impulsomat E 473 derselben Firma dient er auch als pH-Stat.

Die Aminosäurenanalysen werden an einem Beckmann Unichrom Analysator und an einem Kontron Liquimat III durchgeführt. Vor Auftragen der Probenlösung werden die Proben mindestens 18 h mit 6N HCl bei 120° C hydrolysiert.

Für den Racemattest werden die Proben nach möglichst schonender Hydrolyse durch Veresterung mit Propanol und Acylierung mit Pentafluorpropionsäure derivatisiert. Die Messung erfolgt an einer mit Chirasil-Val belegten Glaskapillare (20 m) und einem linearen Temperaturprogramm (80-200° C, 4° C/min). Als Gaschromatographen dienen ein Fractovap Mod. G 1, Carlo Erba und ein Fractovap 2101 AC, Carlo Erba.

V.4. Chemikalien

Die Lösungsmittel werden nach üblichen Vorschriften getrocknet und anschließend über eine 140 cm Vigreux-Kolonne unter Feuchtigkeitsausschluß destilliert. Die Aufbewahrung der Lösungsmittel erfolgt über Molekularsieb (Fa. Merck, Darmstadt, 3 bzw. 4 Å).

Die verwendeten Aminosäuren sind ausschließlich Produkte der Fa. Merck und haben alle L-Konfiguration. N-Hydroxysuccinimid wird von der Fa. Senn-Chemicals, Dielsdorf, Schweiz und 1-Hydroxybenzotriazol von der Fa. Fluka, Buchs,

Schweiz, bezogen und haben Synthese- oder Analysenqualität.

Folgende Ausgangsverbindungen werden nach Literaturangaben synthetisiert: tert.-Butyloxycarbonylazid (Boc-Azid) aus Carbazinsäure-tert.-butylester und Natriumnitrit in Eisessig[299], Benzyloxycarbonylchlorid aus Benzylalkohol und Phosgen[300]. Zur Berechung der Molekulargewichte werden folgende Atomgewichte verwendet: C = 12.011, H = 1.008, N = 14.007, O = 15.999, Cl = 35.453, F = 18.998.

V.5. Synthese des Thymosin β_9 (1-7) nach Syntheseweg 1 (Ac-L-Ala-L-Asp-L-Lys-L-Pro-L-Asp-L-Leu-Gly-OH)

V.5.1. Glycinmethylester.Hydrochlorid (H-Gly-OMe.HCl)

H-Gly-OMe.HCl wird nach Zitat[301] aus Glycin, Thionylchlorid und Methanol hergestellt.

Ausbeute: 94 g (92 %)

Fp.: 183-185° C, Lit.: 175° C[302]

Rf_A: 0.58, Rf_D: 0.26

$C_3H_8NO_2Cl$ (125.6) Ber: C 28.70 H 6.42 N 11.15 Cl 28.24

Gef: C 28.55 H 6.76 N 11.07 Cl 28.58

V.5.2. N-Benzyloxycarbonyl-L-Leucin (Z-L-Leu-OH)

Z-L-Leu-OH wird mittels Carbobenzoxychlorid und Leucin nach Zitat[303] dargestellt.

Ausbeute: 101 g (94,8 %)

Fp.: Öl

Rf_D: 0.48, Rf_H: 0.46

$[\alpha]_D^{21}$: -19.2 (c=0.51,EtOH)

$[\alpha]_D^{22}$ Lit: -16.4 (c=1.83,EtOH)[304]

$C_{14}H_{19}NO_4$ (265.3)

V.5.3. N-Benzyloxycarbonyl-L-leucyl-glycinmethylester (Z-L-Leu-Gly-OMe)

Zu 87.6 g (0.33 Mol) Z-L-Leu-OH in 1000 ml THF gibt man 43.9 g (0.35 Mol) H-Gly-OMe.HCl und 90 g (0.66 Mol) HOBt.

Nach Abkühlen der Reaktionsmischung auf -10° C werden 35.4 g (0.35 Mol) N-Methylmorpholin zugegeben, sowie die vorgekühlte Lösung von 74.2 g (0.36 Mol) DCCI in 200 ml THF. Man läßt auf Raumtemperatur kommen und rührt noch 18 Stunden. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird in der Kälte abfiltriert und das Filtrat zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in EE unter Erwärmen gelöst. Nach Zugabe von wenig PE 40/60 kristallisiert das Dipeptid aus.

Ausbeute: 97.4 g (88 %)

Fp.: 92-93° C, Lit.: 93° C[305], 93-94° C[306]

Rf_D: 0.71, Rf_H: 0.48

$[\alpha]_D^{24}$: -29.1 (c=1.00,MeOH)

$C_{17}H_{24}N_2O_5$ (336.4) Ber: C 60.70 H 7.19 N 8.33

Gef: C 60.90 H 7.33 N 8.49

V.5.4. L-Leucyl-glycinmethylester.Hydrochlorid (H-L-Leu-Gly-OMe.HCl)

63.3 g (0.2 Mol) Z-L-Leu-Gly-OMe werden in 1000 ml MeOH gelöst und nach Zugabe von 6.7 g Pd(10 %)/Aktivkohle im Durchflußverfahren hydriert. Der pH-Wert wird mit 3N HCl/Ether auf 5.0 gehalten. Nach 5 Stunden wird die Lösung über Celite filtriert und eingedampft. Der verbleibende, leicht bräunliche Schaum wird ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Ausbeute: 47 g (99 %)

Fp.: 58-65° C (amorph)

Rf_A: 0.46, Rf_D: 0.42

$[\alpha]_D^{21}$: +21.02 (c=1.00,MeOH)

$C_9H_{19}N_2O_3Cl$ (238.7) Ber: C 45.28 H 8.02 N 11.73 Cl 14.85

Gef: C 43.95 H 8.24 N 11.17 Cl 15.59

V.5.5. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-ß-tert.-butylester (Z-L-Asp(OBu^t)-OH)

V.5.5.1. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure (Z-L-Asp-OH)

Z-L-Asp-OH wird nach Wünsch et al.[307] in 89 %iger Ausbeute aus Z-Cl und Asparaginsäure synthetisiert.

Fp.: 114-115° C, Lit.: 116° C[308]

Rf_A: 0.71, Rf_D: 0.19

$[\alpha]_D^{20}$ +9.25 (c=2.00,MeOH)

$[\alpha]_D$ Lit: +9.25 (c=2.00,MeOH)

$C_{12}H_{13}NO_6$ (267.2) Ber: C 53.39 H 4.90 N 5.24

Gef: C 54.53 H 5.18 N 5.28

V.5.5.2. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäureanhydrid (Z-L-Asp-O)

Das Anhydrid wird nach John et al. aus Z-L-Asp-OH und Essigsäureanhydrid dargestellt.

Ausbeute: 198.4 g (98 %)

Fp.: 108-112° C, Lit.: 111° C[309]

Rf_D: 0.45

$[\alpha]_D^{25}$: -32.0 (c=2.00,HAc)

$[\alpha]_D^{15}$ Lit.:-37.2 (c=2.88,HAc)

$C_{12}H_{11}NO_5$ (249.2) Ber: C 57.83 H 4.45 N 5.62

Gef: C 57.39 H 4.54 N 5.68

V.5.5.3. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-α-p-nitrobenzylester (Z-L-Asp-α-ONb)

Die Darstellung des Esters erfolgt nach Schröder et al.[310] in 75 %iger Ausbeute.

Fp.: 124-125.5° C, Lit.: 124-125° C

Rf_D: 0.46, Rf_H: 0.31

$[\alpha]_D^{26}$: -16.5 (c=1.00,HAc)

$[\alpha]_D^{25}$ Lit: -17.8 (c=1.00,95 % HAc)

$C_{19}H_{18}N_2O_8$ (402.4) Ber: C 56.71 H 4.51 N 6.69

Gef: C 56.67 H 4.60 N 6.91

V.5.5.4. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure(ß-tert.-butylester)-α-p-nitrobenzylester (Z-L-Asp(OBu^t)-ONb)

Die Darstellung der Verbindung erfolgt nach Schröder et al.[310] aus Z-L-Asp-α-ONb und Isobutylen. Es wird jedoch eine größere Menge an Lösungsmittel und Isobutylen verwendet. Umkristallisiert wird aus MeOH.

Ausbeute: 111.3 g (83 %)

Fp.: 112-114° C, Lit.: 93-94° C

Rf_D: 0.86, Rf_E: 0.49

$[\alpha]_D^{25}$: -16.1 (c=1.00,MeOH)

$[\alpha]_D$ Lit: -16.6 (c=1.00,MeOH)

$C_{23}H_{26}N_2O_8$ (458.5) Ber: C 60.25 H 5.72 N 6.11

Gef: C 60.36 H 5.70 N 6.20

V.5.5.5. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure(ß-tert.-butylester)- α-dicyclohexylammoniumsalz (Z-L-Asp(OBu^t)-OH.DCHA)

Z-L-Asp(OBu^t)-ONb wird nach Zitat[310] in 93 %iger Ausbeute verseift und in das Dicyclohexylammoniumsalz übergeführt.

Fp.: 124.5-125.5° C, Lit.: 125-126.5° C[311]

Rf_D: 0.55, Rf_H: 0.42

$[\alpha]_D^{23}$: +5.6 (c=1.00,90 %HAc)

$[\alpha]_D^{20}$ Lit; +5.5 (c=1.00,90 %HAc)[311]

$C_{28}H_{44}N_2O_6$ (504.7) Ber: C 66.64 H 8.79 N 5.55

Gef: C 66.57 H 8.89 N 5.56

V.5.6. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (Z-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe)

44.8 g (10.14 Mol) Z-L-Asp(OBu^t)-OH (freigesetzt mit 10 %iger Citronensäure aus 70.6 g (0.14 Mol) Z-L-Asp(OBu^t)-OH.DCHA), 33.4 g (0.14 Mol) H-L-Leu-Gly-OMe.HCl und 37.8 g (0.28 Mol) HOBt werden in 400 ml abs. DMF gelöst und nach Abkühlen auf -15° C mit 14.2 g (0.14 Mol) N-Methylmorpholin versetzt. 31.8 g (0.15 Mol) DCCI werden dann in wenig DMF gelöst auf einmal zugegeben. Nach 18 Stunden wird in der Kälte vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und im Hochvakuum bei 40° C eingeengt. Der Rückstand wird in EE aufgenommen, mit 10 %iger $NaHCO_3$(5x), 2N Citronensäure (3x) und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Beim Einengen des Filtrats beginnt das Produkt auszukristallisieren.

Ausbeute: 63 g (91 %)

Fp.: 100-102° C

Rf_D: 0.62, Rf_H: 0.52, Rf_E: 0.53

$[\alpha]_D^{20}$: -37.4 (c=1.01,MeOH)

$C_{25}H_{37}N_3O_8$ (507.6) Ber: C 59.16 H 7.35 N 8.28

Gef: C 59.32 H 7.43 N 8.35

Aminosäurenanalyse:	Asp	Leu	Gly
Ber:	1.00	1.00	1.00
Gef:	1.02	1.03	1.00

V.5.7. L-Asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycin-methylester.Hydrochlorid (H-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe.HCl)

35.5 g (87 mMol) Z-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe) werden in 500 ml MeOH gelöst und nach Zugabe von 3.5 g Katalysator und 1 ml Wasser 90 Minuten hydriert. Der pH-Wert von 6.0 wird durch Zugabe von 5N HCl/EE am Autotitrator eingehalten. Der Katalysator wird abfiltriert und das Filtrat zur Trockene eingeengt. Der Rückstand ist chromatographisch einheitlich und kann direkt weiterverwendet werden.

Ausbeute: 27.2 g (97 %)

Fp.: 64-67° C (amorph)

Rf_D: 0.54, Rf_H: 0.14

$[\alpha]_D^{24}$: -19.9 (c=1.00,MeOH)

$C_{17}H_{32}N_3O_6Cl$ Ber: C 49.81 H 7.87 N 10.25 Cl 8.65

Gef: C 49.95 H 8.06 N 9.65 Cl 7.12

V.5.8. N-Benzyloxycarbonyl-L-prolin (Z-L-Pro-OH)

Die Darstellung von Z-L-Pro-OH erfolgt nach Zitat[312])

Ausbeute: 110 g (89 %)

Fp.: 75-76° C, Lit.: 76-77° C[313])

Rf_D: 0.41, Rf_H: 0.45

$[\alpha]_D^{20}$: -40.0 (c=2.00,EtOH), -59.8 (c=2.00,HAc)

$[\alpha]_D^{20}$ Lit: -40.6 (c=2.00,EtOH), -60.5 (c=2.00,HAc)

$C_{13}H_{15}NO_4$ (249.3) Ber: C 62.64 H 6.06 N 5.62

Gef: C 62.39 H 6.05 N 5.57

V.5.9. N-Benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (Z-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe)

27.2 g (66 mMol) H-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe.HCl, 19.0 g (76.2 mMol) Z-L-Pro-OH und 17.8 g (0.13 Mol) HOBt werden in 400 ml abs. DMF gelöst und nach Abkühlen auf -10° C mit 6.73 g (66 mMol) N-Methylmorpholin versetzt. Nach Zugabe von 15.1 g (73 mMol) DCCI läßt man auf Raumtemperatur erwärmen und rührt noch 18 Stunden. In der Kälte wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Filtrat im Hochvakuum zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in EE aufgenommen. Die organische Phase wird mehrmals alkalisch (10 %ige $NaHCO_3$), sauer (10 %ige Citronensäure) und mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Der nach Abfiltrieren und Eindampfen verbleibende Rückstand wird aus EE/PE umkristallisiert.

Ausbeute: 28.9 g (72 %)

Fp.: 155-161° C

Rf_D: 0.64, Rf_H: 0.45

$[\alpha]_D^{20}$: -71.7 (c=1.00,MeOH)

$C_{30}H_{44}N_4O_9$ (604.7) Ber: C 59.59 H 7.33 N 9.26

Gef: C 59.34 H 7.50 N 9.42

Racemattest: 0.1 % D-Pro, 0.6 % D-Asp, o.6 % D-Leu

V.5.10. L-Prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (H-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe)

9.9 g (16.4 mMol) Z-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe) werden in 150 ml MeOH und 1 ml Wasser gelöst und nach Zugabe von 1 g Pd(10 %)/C-Katalysator eine Stunde entacyliert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Einengen erhält man einen chromatographisch einheitlichen, weißen Schaum, der ohne weitere Reinigung eingesetzt wird.

Ausbeute: 7.7 g (100 %)

Fp.: 62-65° C (amorph)

Rf_A: 0.57, Rf_D: 0.43

$[\alpha]_D^{24}$: -62.0 (c=0.99,MeOH)

$C_{22}H_{38}N_4O_7$ (507.0) Ber: C 52.12 H 7.75 N 11.05

Gef: C 51.91 H 7.95 N 11.35

V.5.11. N^{ϵ}-tert.-Butyloxycarbonyl-L-Lysin (H-L-Lys(Boc)-OH)

V.5.11.1. N^{ϵ}-Benzyliden-L-Lysin (H-L-Lys(Bal)-OH

437 g (2.4 Mol) Lysin.Hydrochlorid werden unter Stickstoff in 1200 ml 2N LiOH unter kräftigem Rühren gelöst. Nach Abkühlen auf 1° C tropft man 254 ml (2.5 Mol) frisch destillierten und stickstoffgesättigten Benzaldehyd so zu, daß die Temperatur stets unter 4° C bleibt. Nach Zugabe des Benzaldehyds läßt man die Reaktionsmischung 24 Stunden bei

3-5° C stehen. Danach wird mit 700 ml kaltem Ethanol verdünnt und filtriert. Der Rückstand wird erneut in 350 ml kaltem Ethanol suspendiert, anschließend filtriert und im Hochvakuum über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 432 g (77 %)

Fp.: 182-186° C, Lit.: 206-208° C[341)]

$C_{13}H_{18}N_2O_2$ (234.3) Ber: C 66.64 H 7.74 N 11.96

Gef: C 64.61 H 7.50 N 11.27

V.5.11.2. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin (Z-L-Lys-OH)

120 g (0.512 Mol) H-L-Lys(Bal)-OH werden in eine auf -30° C gekühlte Mischung von 1000 ml 1N NaOH/EtOH (1:1) eingetragen. Zu dieser Lösung läßt man gleichzeitig 150 ml (1 Mol) auf - 20° C vorgekühltes Carbobenzoxychlorid, sowie eine ebenfalls auf -20° C vorgekühlte Mischung von 1250 ml 1N NaOH/990 ml EtOH zutropfen, so daß die Zugabe gleichzeitig beendet ist. Man läßt die Reaktionslösung auf -5° C kommen und fügt bei dieser Temperatur 125 ml (1.5 Mol) einer auf 3° C gekühlten konz. HCl-Lösung hinzu. Nun wird solange bei 50° C gerührt, bis sich alles gelöst hat. Die Lösung wird auf 1.5 ltr. eingeengt und dreimal ausgeethert. Dann wird die Wasserphase mittels 2N NaOH auf pH 6.2 gebracht und eventuell entstandenes N^{ε}-Z-Lysin abfiltriert. Das Filtrat wird etwas eingeengt und bei 3° C aufbewahrt. Das ausgefallene N^{α}-Z-L-Lys-OH wird abgesaugt und aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 122 g (85 %)

Fp.: 226° C, Lit.: 226-228° C[315)]

Rf_A: 0.44, Rf_D: 0.14

$[\alpha]_D^{23}$: -10.0 (c=1.00,0.2N HCl)

$[\alpha]_D^{26}$ Lit: -12.0 (c=2.00,0.2N HCl)

$C_{14}H_{20}N_2O_4$ (280.3) Ber: C 59.98 H 7.19 N 10.00

Gef: C 59.93 H 7.28 N 10.22

V.5.11.3. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin.Dicyclohexylammoniumsalz (Z-L-Lys(Boc)-OH.DCHA)

140 g (0.5 Mol) N^{α}-Z-L-Lys-OH werden in 500 ml Dioxan und 250 ml 2N NaOH gelöst, mit 2.5 g Magnesiumoxid und 80 g (0.55 Mol) Boc-Azid versetzt und 24 Stunden bei 45° C gerührt. Danach wird etwas eingeengt, mit EE überschichtet und mit Citronensäure auf pH 3 angesäuert. Die EE-Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase noch einmal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden neutral gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtration wird eingeengt, in Ether aufgenommen und mit 90.6 g (0.5 Mol) Dicyclohexylamin versetzt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und aus EtOH/H_2O umkristallisiert.

Ausbeute: 256 g (91 %)

Fp.: 153° C, Lit.: 150-153° C[316)]

Rf_A: 0.83, Rf_D: 0.48

$[\alpha]_D^{23}$: +6.9 (c=1.00,EtOH)

$[\alpha]_D^{20}$ Lit: +7.8 (c=1.00,EtOH)

$C_{31}H_{51}N_3O_6$ (561.8) Ber: C 66.28 H 9.15 N 7.48

Gef: C 66.03 H 9.14 N 7.49

V.5.11.4. N^{ε}-tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysin (H-L-Lys(Boc)-OH)

Methode 1: 40 g (0.1 Mol) Z-L-Lys(Boc)-OH werden in 640 ml MeOH und 100 ml Wasser gelöst, mit 4 g Pd(10 %)/C versetzt und 18 Stunden im Durchflußverfahren hydriert. Das ausgefallene H-L-Lys(Boc)-OH wird durch Zugabe von 1000 ml Wasser in Lösung gebracht. Nach Entfernen des Katalysators wird eingeengt, wobei das Produkt ausfällt.

Ausbeute: 23.8 g (92 %)

Fp.: 255-256° C, Lit.: 237-255° C[317)]

Rf_A: 0.38, Rf_D: 0.19

$[\alpha]_D^{25}$: +5.1 (c=1.00,2N NH_3)

$[\alpha]_D^{26}$ Lit: +4.7 (c=0.88,2N NH_3)

$C_{11}H_{22}N_2O_4$ (246.3) Ber: C 53.64 H 9.00 N 11.37

Gef: C 53.38 H 9.04 N 11.24

Methode 2: H-L-Lys(Boc)-OH wird wie in Zitat[317)] über den Kupferkomplex mit Boc-Azid in 35 %iger Ausbeute synthetisiert.

Fp.: 260-264° C, Lit.: 259-260° C[318)]

Rf_A: 0.38, Rf_D: 0.21

$[\alpha]_D^{25}$: +4.9 (c=1.00,2N NH_3)

$[\alpha]_D^{26}$ Lit: +4.7 (c=1.00,2N NH_3)

$C_{11}H_{22}N_2O_4$ (246.3) Ber: C 53.64 H 9.00 N 11.37

Gef: C 52.71 H 8.96 N 11.45

V.5.12. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure(ß-tert.-butylester)-N-hydroxysuccinimidester (Z-L-Asp(OBu^t)-OSu)

Der Aktivester wird nach Anderson et al.[319)] aus Z-L-Asp-(OBu^t)-OH, HOSu und DCCI dargestellt.

Ausbeute: 42 g (76 %)

Fp.: 149-152° C, Lit.: 151.5-152.5° C[320)]

Rf_D: 0.78, Rf_H: 0.80

$[\alpha]_D^{23}$: -18.7 (c=1.00,Dioxan)

$[\alpha]_D^{21}$ Lit: -19.4 (c=1.12,Dioxan)

$C_{20}H_{24}N_2O_8$ (420.4) Ber: C 57.14 H 5.75 N 6.66

Gef: C 57.66 H 5.76 N 6.47

V.5.13. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin.Dicyclohexylammoniumsalz (Z-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-OH.DCHA)

6.2 g (25 mMol) H-L-Lys(Boc)-OH und 2.65 g (25 mMol) Na_2CO_3 werden in 150 ml H_2O/DMF (9:1) klar gelöst. Dann tropft man bei 0° C 10.5 g (25 mMol) Z-L-Asp(OBu^t)-OSu gelöst in 50 ml DMF zu. Hierbei kann sich die Reaktionsmischung eintrüben. Nach Erreichen der Raumtemperatur rührt man noch 18 Stunden, engt ein und nimmt den Rückstand in Wasser auf. Man filtriert von Unlöslichem ab, säuert mit Citronensäure auf pH 4 an und extrahiert dreimal mit EE. Die organische Phase wird neutral gewaschen, getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wird in wenig EE aufgenommen und bis zur leichten Trübung mit PE 40/60 versetzt. Dann gibt man 5 g (27 mMol) DCHA gelöst in 30 ml Diisopropylether zu. Das über Nacht ausgefallene Produkt wird abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 16 g (87.4 %)

Fp.: ab 93° C sintern, 142-145° C (Zers.)

Rf_D: 0.54, Rf_H: 0.29

$[\alpha]_D^{23}$: + 56.8 (c=1.00,MeOH)

$C_{39}H_{64}N_3O_9$ (718.9) Ber: C 63.91 H 8.80 N 7.64

Gef: C 63.26 H 8.72 N 7.46

V.5.14. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (Z-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe)

9.0 g (16.4 mMol) Z-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-OH (mit Citronensäure aus dem DCHA-Salz freigesetzt), 7.7 g (16.4 mMol) H-

L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe.HCl und 4.32 g (32 mMol) HOBt werden in 200 ml DMF gelöst. Nach Abkühlen auf -10° C wird mit 1.8 ml (16.4 mMol) N-Methylmorpholin versetzt. Nach 5 Minuten gibt man 3.7 g (18 mMol) DCCI, gelöst in 40 ml DMF und auf -10° C vorgekühlt, auf einmal zu. Nach Erreichen der Raumtemperatur wird noch 18 Stunden gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird in der Kälte abfiltriert und die Reaktionslösung im Hochvakuum eingeengt. Der Rückstand wird in EE aufgenommen, von Unlöslichem abfiltriert mit 5 %iger $NaHCO_3$ (4x), 20 %iger Citronensäure (3x), Wasser (2x) und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Der nach Einengen verbleibende ölige Rückstand wird aus Ether/Diisopropylether umkristallisiert.

Ausbeute: 13.2 g (82.5 %)

Fp.: 90-94° C

Rf_D: 0.55, Rf_H: 0.45

$[\alpha]_D^{24}$: -60.6 (c=0.98,MeOH)

$C_{49}H_{77}N_7O_{15}$ (1004.2) Ber: C 58.61 H 7.73 N 9.76

Gef: C 57.84 H 7.56 N 9.58

Aminosäurenanalyse:	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly
Ber:	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Gef:	1.85	0.95	1.05	0.96	1.00

V.5.15. L-Asparagyl (ß-tert.-butylester)-N$^\varepsilon$-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl (ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (H-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe)

2.6 g (2.6 mMol) des Hexapeptidmethylesters werden in 100 ml MeOH gelöst und nach Zugabe von 300 mg Katalysator 30 Minuten im Durchflußverfahren hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Einengen erhält man einen chromatogra-

phisch einheitlichen weißen Schaum, der ohne weitere Kristallisationsversuche eingesetzt wird.

Ausbeute: 2.25 g (100 %)

Fp.: 54-59° C (amorph)

Rf_D: 0.45, Rf_H: 0.13

$[\alpha]_D^{25}$: -49.4 (c=1.01,MeOH)

$C_{41}H_{71}N_7O_{13}$ (870.1) Ber: C 56.60 H 8.23 N 11.27

Gef: C 56.17 H 8.34 N 11.09

V.5.16. N-Acetyl-L-alanin (Ac-L-Ala-OH)

89.1 g (1 Mol) L-Alanin wird in 900 ml konz. HAc suspendiert und auf 15° C gekühlt. Dann tropft man 102.1 g (1 Mol) frisch destilliertes Acetanhydrid zu, so daß die Temperatur bei 15° C bleibt. Nach 18 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird bei 40° C Badtemperatur eingeengt, einmal mit 200 ml Wasser und viermal mit 100 ml Wasser aufgeschlämmt und wieder eingeengt. Um alles Wasser zu entfernen wird der Rückstand dreimal in 200 ml abs. Benzol digeriert und wieder eingedampft. Der feste Rückstand wird in heißem EE gelöst und von unlöslichem Alanin abfiltriert. Beim Stehenlassen kristallisiert das Ac-L-Ala-OH aus.

Ausbeute: 125 g (97 %)

Fp.: 117-125° C, Lit.: 125° C[321)]

Rf_A: 0.52, Rf_D: 0.18

$[\alpha]_D^{20}$: -65.6 (c=1.00,H_2O)

$[\alpha]_D^{20}$ Lit: -66.2 (H_2O)

$C_5H_9NO_3$ (131.1) Ber: C 45.80 H 6.92 N 10.68

Gef: C 45.70 H 6.99 N 10.76

V.5.17. N-Acetyl-L-alanin-N-hydroxysuccinimidester (Ac-L-Ala-OSu)

Der Aktivester wird analog Zitat[319] aus Ac-L-Ala-OH, HOSu und DCCI in Dimethoxyethan dargestellt. Die Zugabe des DCCI sollte bei -30° C erfolgen. Es wird zweimal aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 32.8 g (72 %)

Fp.: 116-118° C

Rf_D: 0.64, Rf_E: 0.19

$[\alpha]_D^{20}$: -25.8 (c=0.50,H_2O)

$C_9H_{12}N_2O_5$ (228.2) Ber: C 47.37 H 5.30 N 12.28

Gef: C 47.66 H 5.46 N 12.27

V.5.18. N-Acetyl-L-alanyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (Ac-L-Ala-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe)

Methode 1: 6.0 g (6.9 mMol) H-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe, 995 mg (7.6 mMol) Ac-L-Ala-OH und 1.02 g (7.6 mMol) HOBt werden in 150 ml abs. DMF gelöst und mit N-Methylmorpholin auf pH 7-8 eingestellt. Nach Abkühlen auf -20° C werden 1.56 g (7.6 mMol) DCCI zugegeben. Nach 18 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird abgekühlt, der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgetrennt und das Filtrat zur Trockene eingeengt. Nach Aufnahme in EE wird basisch (5 %ige $NaHCO_3$), sauer (10 %ige Citronensäure) und neutral gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Der nach Einengen verbleibende Rückstand wird mehrmals aus EE/Ether umkristallisiert.

Methode 2: 2.25 g (2.6 mMol) desacylierter Hexapeptidmethylester werden in 100 ml abs. Methylenchlorid gelöst. Nach Abkühlen auf 10° C gibt man 640 mg (2.8 mMol) Ac-L-Ala-OSu und 283 mg (2.8 mMol) Triethylamin zu. Nach 6stündigem Rühren wird zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in EE aufgenommen, mit 5 %iger $NaHCO_3$, 10 %iger Citronensäure, Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtrieren und Einengen wird der schaumige Rückstand aus EE/Ether umkristallisiert.

Ausbeute: Methode 1: 4 g (60 %)

Methode 2: 2.1 g (82.7 %)

Fp.: Methode 1: 106-132° C

Methode 2: 130.5-132° C

Rf_D: 0.69, Rf_E: 0.13, Rf_F: 0.93, Rf_H: 0.32

Methode 1: $[\alpha]_D^{25}$: -71.1 (c=1.00,MeOH)

Methode 2: $[\alpha]_D^{25}$: -74.6 (c=1.00,MeOH)

$C_{46}H_{78}N_8O_{15}$ (983.2) Ber: C 56.20 H 8.00 N 11.40

Methode 1: Gef: C 55.94 H 8.08 N 11.24

Methode 2: Gef: C 55.64 H 8.08 N 11.24

Aminosäurenanalyse:		Ala	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly
	Ber:	1.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Methode 1:	Gef:	1.02	1.85	0.94	1.03	1.00	1.01
Methode 2:	Gef:	1.04	2.00	1.00	1.00	1.00	0.98

Racemattest:	% D-Ala	% D-Asp	% D-Lys	% D-Pro	% D-Leu
Methode 1:	1.1	14.4	6.8	0.5	1.0
	4.7	6.6	2.2	1.6	2.8

V.5.19. N-Acetyl-L-alanyl-L-asparagyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl-L-leucyl-glycin (Thymosin β_9 (1-7)) (Ac-L-Ala-L-Asp-L-Lys-L-Pro-L-Asp-L-Leu-Gly-OH)

390 mg (0.4 mMol) vollgeschütztes Heptapeptid werden in 10 ml MeOH gelöst und mit 440 µl 1N NaOH (0.44 mMol) 60 Minuten verseift. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 0.1N HCl auf pH 7 gebracht und vollständig eingeengt. Der Rückstand wird mit 3 ml Anisol und 17 ml auf 4° C gekühlte TFA versetzt und 1 Stunde gerührt. Dann wird mit 200 ml abs. Ether verdünnt. Nach 15 Minuten Rühren wird der entstandene Niederschlag abgesaugt. Man erhält 300 mg weißes Pulver (100 %). Dies wird durch Gelfiltration an Sephadex G15 und Chromatographie an Kieselgel gereinigt.

Ausbeute: 160 mg (53 %)

Fp.: 57-60° C (lyophylisiert)

Rf_C: 0.09, Rf_B: 0.31

$[\alpha]_D^{20}$: -58.8 (c=0.51,H_2O)

$C_{32}H_{52}N_8O_{13} \times 4\ H_2O$ (828.9) Ber: C 46.37 H 7.30 N 13.52

Gef: C 45.07 H 7.32 N 13.89

Aminosäurenanalyse:	Ala	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly
Ber:	1.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Gef:	1.03	1.98	1.04	0.95	1.02	1.00

Racemattest:	D-Ala	D-Asp	D-Lys	D-Pro	D-Leu
	3.7 %	6.3 %	2.8 %	2.6 %	2.5 %

V.6. Synthese des Thymosin β_9 (1-7) nach Syntheseweg 2 (Ac-L-Ala-L-Asp-L-Lys-L-Pro-L-Asp-L-Leu-Gly-OH)

V.6.1. N-Benzyloxycarbonyl-L-leucyl-glycin (Z-L-Leu-Gly-OH)

25.5 g (76 mMol) des nach Syntheseweg 1 hergestellten Z-L-Leu-Gly-OMe werden in 230 ml MeOH gelöst und innerhalb von 45 Minuten mit 85 ml (84 mMol) 1N NaOH verseift. Man neutralisiert mit 1N HCl und verdünnt mit 200 ml Wasser. Nach Abkühlen auf 0° C wird mit EE überschichtet und mit H_3PO_4 auf pH 2.5 angesäuert. Die EE-Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingeengt. Der Rückstand wird unter Erwärmen in EE gelöst. Nach Zugabe von PE 40/60 kristallisiert das Produkt aus.

Ausbeute: 21.3 g (87.3 %)

Fp.: 114-117° C

Rf_D: 0.64, Rf_H: 0.25

$[\alpha]_D^{20}$: -24.9 (c=0.99,MeOH)

$C_{16}H_{22}N_2O_5$(322.4) Ber: C 59.61 H 6.88 N 8.69

Gef: C 59.32 H 6.93 N 8.67

V.6.2. L-Leucyl-glycin.Hydrochlorid (H-L-Leu-Gly-OH.HCl)

20.3 g (63 mMol) Z-L-Leu-Gly-OH werden in 250 ml MeOH gelöst und mit 63 ml 1N HCl versetzt. Nach Zugabe von 2 g Pd(10 %)/Aktivkohle wird eine Stunde entacyliert. Der Katalysator wird abfiltriert und das Filtrat zur Trockene eingeengt. Der weiße, schaumige Rückstand ist chromatographisch einheitlich und wird ohne weitere Kristallisation eingesetzt.

Ausbeute: 14.1 g (100 %)

Fp.: 73-78^{6} C (amorph)

Rf_D: 0.28, Rf_F: 0.39

$[\alpha]_D^{20}$: +43.4 (c=1.01,MeOH)

$C_8H_{16}N_2O_3$ x 2/3 HCl (212.5) Ber: C 45.21 H 7.90 N 12.61

Gef: C 44.39 H 8.23 N 13.18

V.6.3. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycin (Z-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH)

14.15 g (63 mMol) H-L-Leu-Gly-OH.HCl und 27.7 g (66 mMol) Z-L-Asp(OBu^t)-OSu werden in 300 ml DMF/CH_2Cl_2 (1:1) gelöst und auf 4^{o} C abgekühlt. Nach Zugabe von 6.4 g (63 mMol) N-Methylmorpholin kommt es zu einer starken Eintrübung, welche nach 10 Minuten wieder verschwindet. Nach 18stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird im Hochvakuum eingedampft und der ölige Rückstand in EE aufgenommen. Das Produkt wird durch Extraktion mit 5 %iger $NaHCO_3$ in die wässrige Phase überführt und somit von nicht umgesetztem Z-L-Asp(OBu^t)-OSu abgetrennt. Nach Ansäuern auf pH 3 und Extraktion mit EE wird die organische Phase neutral gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Der nach Einengen erhaltene ölige Rückstand wird aus EE/PE umkristallisiert.

Ausbeute: 30 g (96.5 %)

Fp.: 126-130° C

Rf_D: 0.41, Rf_H: 0.36

$[\alpha]_D^{25}$: -33.8 (c=1.00,MeOH)

$C_{24}H_{35}N_3O_8$ (493.6) Ber: C 58.41 H 7.15 N 8.51

Gef: C 58.22 H 7.26 N 8.39

V.6.4. L-Asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycin (H-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH)

30 g (61 mMol) Z-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH werden in 360 ml MeOH/H_2O (5:1) und 4 ml HAc gelöst, mit 3 g Pd(10 %)/C versetzt und eine Stunde im Durchflußverfahren hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Einengen des Filtrats verbleibt ein weißer, pulvriger Rückstand, welcher chromatographisch einheitlich ist.

Ausbeute: 26 g (99 %)

Fp.: 164° C (Zers.)

Rf_D: 0.22, Rf_F: 0.37

$[\alpha]_D^{25}$: -19.4 (c=1.01,MeOH)

$C_{16}H_{29}N_3O_6$ x Acetat (419.5) Ber: C 51.54 H 7.93 N 10.02

Gef: C 51.32 H 8.13 N 10.68

V.6.5. N-Benzyloxycarbonyl-L-prolin-N-hydroxysuccinimidester (Z-L-Pro-OSu)

Z-L-Pro-OSu wird aus Z-L-Pro-OH, DCCI und HOSu nach Anderson et al.[319] dargestellt. Die Zugabe des DCCI erfolgt bei -25° C.

Ausbeute: 43 g (74 %)

Fp.: 86-88° C, Lit.: 89-91° C[322])

Rf_D: 0.71, Rf_H: 0.64

$[\alpha]_D^{20}$: -55.0 (c=1.00,Dioxan)

$[\alpha]_D^{20}$Lit.: -54.0 (c=2.00 Dioxan)

$C_{17}H_{18}N_2O_6$ (346.3) Ber: C 58.95 H 5.24 N 8.09

Gef: C 59.16 H 5.28 N 8.05

V.6.6. N-Benzyloxycarbonyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycin (Z-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH)

24 g (57 mMol) H-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH werden in 300 ml DMF suspendiert. Nach Zugabe von 9.6 g (114 mMol) $NaHCO_3$ erhält man eine klare Reaktionslösung, welche nach Abkühlen auf -5° C mit 21 g (59 mMol) Z-L-Pro-OSu versetzt wird. Man läßt auf Raumtemperatur erwärmen und rührt noch 18 Stunden. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird in der Kälte abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Der gelbe, ölige Rückstand wird zwischen EE und Wasser verteilt und die wässrige Phase mit verd. H_2SO_4 auf pH 2.5 gebracht. Zur Reinigung wird das Produkt durch dreimalige Extraktion mit 5 %iger $NaHCO_3$ in die wässrige Phase gebracht und mit EE nach Ansäuern mit H_3PO_4 auf pH 3.5 wieder extrahiert. Es verbleibt ein öliger Rückstand, welcher mehrmals aus EE/Ether umkristallisiert wird.

Ausbeute: 16.6 g (52 %)

Fp.: 117.5-120° C

Rf_D: 0.43, Rf_F: 0.60

$[\alpha]_D^{25}$: -67.6 (c=1.00,MeOH)

$C_{29}H_{42}N_4O_9$ (590.7) Ber: C 58.97 H 7.17 N 9.49

Gef: C 58.12 H 7.22 N 9.11

Aminosäurenanalyse:	Pro	Asp	Leu	Gly
Ber:	1.00	1.00	1.00	1.00
Gef:	1.05	0.97	0.99	1.00

Racemattest: 1 % D-Pro, 9.6 % D-Asp, 1 % D-Leu

V.6.7. L-Prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycin (H-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH)

11 g (18.6 mMol) Z-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH werden in 200 ml MeOH gelöst. Man gibt 1.1 g Katalysator dazu und hydriert im Durchflußverfahren. Das Produkt fällt im Laufe der Reaktion aus und wird durch Zugabe von 100 ml Wasser wieder in Lösung gebracht. Nach 45 Minuten wird vom Katalysator abfiltriert, eingedampft und aus Wasser/MeOH umkristallisiert.

Ausbeute: 8.3 g (97.8 %)

Fp.: 215° C (Zers.)

Rf_A: 0.40, Rf_F: 0.56

$[\alpha]_D^{25}$: -68.2 (c=1.00,H_2O)

$C_{21}H_{36}N_4O_7$ x 1/2 H_2O (456.5) Ber: C 54.18 H 8.01 N 12.03

Gef: C 53.95 H 7.97 N 11.93

V.6.8. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl-(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin-N-hydroxysuccinimidester (Z-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-OSu)

10.2 g (18.5 mMol) Z-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-OH (aus dem DCHA-Salz mit Citronensäure freigesetzt) werden in 150 ml Ethylenglykoldimethylether gelöst, mit 2.23 g (19.4 mMol) HOSu versetzt und auf -30° C gekühlt. Dann gibt man 4.23 g (20.4 mMol) DCCI, gelöst in 40 ml DMF und vorgekühlt, zu. Nach Er-

wärmen auf Raumtemperatur rührt man noch 3 Stunden. Es wird wie üblich aufgearbeitet und aus EE umkristallisiert.

Ausbeute: 10.2 g (85 %)

Fp.: 81-105° C

Rf_D: 0.65, Rf_H: 0.45

$[\alpha]_D^{20}$: -96.1 (c=0.51,MeOH)

$C_{31}H_{44}N_4O_{11}$ (648.7) Ber: C 57.40 H 6.84 N 8.64

Gef: C 57.48 H 6.94 N 8.61

V.6.9. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycin (Z-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH)

4.2 g (9.2 mMol) H-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH und 1.55 g (18.4 mMol) $NaHCO_3$ werden in 120 ml H_2O/DMF (2:1) klar gelöst. Dann gibt man 6 g (9.2 mMol) Z-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-OSu, gelöst in 60 ml DMF, zu. Nach 18stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird zur Trockene eingedampft, mit Wasser aufgenommen und von Unlöslichem abfiltriert. Die wässrige Phase wird mit H_3PO_4 nach Überschichten mit EE auf pH 3 gebracht. Die organische Phase wird abgetrennt, die wässrige Phase noch zweimal extrahiert und die vereinigten organischen Phasen neutral gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der feste, schaumige Rückstand konnte nicht kristallisiert werden.

Ausbeute: 7 g (77 %)

Fp.: 50-58° C (amorph)

Rf_D: 0.42, Rf_H: 0.41

$[\alpha]_D^{20}$: -26.7 (c=93,MeOH)

$C_{48}H_{75}N_7O_{15}$(990.2) Ber: C 58.23 H 7.64 N 9.90

Gef: C 58.03 H 7.74 N 9.94

Aminosäurenanalyse:		Asp	Lys	Pro	Leu	Gly
	Ber:	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Gef:	1.78	1.05	0.92	1.03	1.00

V.6.10. N-Acetyl-L-alanyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycin (Ac-L-Ala-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH)

4.6 g (4.7 mMol) Z-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OH werden in 150 ml MeOH gelöst und 2 Stunden im Durchflußverfahren mit 460 mg Pd(10 %)/Aktivkohle hydriert. Nach Abfiltrieren vom Katalysator wird im Vakuum zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in 100 ml abs. Dichlormethan gelöst und mit 1.07 g (4.7 mMol) Ac-L-Ala-OSu versetzt. Nach Zugabe von 0.475 g (4.7 mMol) Triethylamin rührt man 18 Stunden bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wird eingengt und zwischen EE/Wasser verteilt und die wässrige Phase mit verd. H_2SO_4 auf pH 3 angesäuert. Nach Abtrennen der organischen Phase wird neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wird mehrmals aus EE umkristallisiert.

Ausbeute: 2.1 g (52 %)

Fp.: 138-142° C

Rf_D: 0.32

$[\alpha]_D^{21}$: -48.5 (c=1.02,MeOH)

$C_{45}H_{76}N_8O_{15}$ (969.1) Ber: C 55.77 H 7.90 N 11.56

Gef: C 55.49 H 7.76 N 11.65

Aminosäurenanalyse:		Ala	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly
	Ber:	1.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Gef:	1.07	2.06	1.01	0.93	1.00	0.97

V.7. Synthese des Thymosin β_9 (1-7) unter Verwendung der t-Bumeoc-Gruppe

V.7.1. Herstellung von 1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl-Aminosäuren

V.7.1.1. 3,5-Di-tert.-butylbenzoesäure

201.0 g (1.26 Mol) Kaliumpermanganat werden in Portionen innerhalb von 3-4 Stunden zu einer Mischung von 103.0 g (0.5 Mol) 3,5-Di-tert.-butyltoluol (dargestellt nach Zitat[323]), 360.0 g (4.5 Mol) Pyridin, 180 g Wasser und 45 g KOH bei 95° C gegeben. Das gebildete Mangandioxid wird nach 12stündigem Stehenlassen abgesaugt und mit 2 N KOH gewaschen. Das Filtrat wird auf ca. 300 ml eingeengt, mit EE überschichtet und mit 4N H_2SO_4 bis zur stark sauren Reaktion angesäuert. Dann wird die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase noch einmal mit EE extrahiert. Die vereinigten EE-Phasen werden mit Wasser neutral gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach Einengen kristallisiert die Säure in kleinen farblosen Nadeln. Falls notwendig, wird aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 67.1 g (57 %)

Fp.: 170° C, Lit.: 171.5-172.5[324], 171-171.6[325]

Rf_D: 0.67

$C_{15}H_{22}O_2$ (234.3) Ber: C 76.88 H 9.46

Gef: C 77.30 H 9.53

V.7.1.2. 3,5-Di-tert.-butylbenzoesäuremethylester

Der Methylester wird nach Zitat[327] aus 3,5-Di-tert.-butylbenzoesäure, Thionylchlorid und Methanol dargestellt.

Ausbeute: 31.4 g (95.7 %)

Fp.: 52-52.5° C, Lit.: 51-52° C[327]

Rf_E: 0.76

$C_{16}H_{24}O_2$ (248.4) Ber: C 77.37 H 9.74

Gef: C 77.87 H 9.90

V.7.1.3. 2-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-2-propanol

Zu 11.7 g (0.48 Mol) Magnesium in 100 ml abs. Ether gibt man zum Start der Reaktion ca. 2 ml Methyliodid. Der Rest von 68.1 g (0.48 Mol) Methyliodid in 100 ml abs. Ether wird anschließend so zugetropft, daß die Reaktionsmischung schwach siedet. Danach wird noch so lange erhitzt, bis sich fast alles Magnesium gelöst hat (1-2 h). Dann werden 30.0 g (0.12 Mol) 3,5-Di-tert.-butylbenzoesäuremethylester in 80 ml Ether so zugetropft, daß die Lösung ständig siedet. Die Reaktionsmischung wird ca. 15 Stunden bei 35° C gerührt. Dann wird auf Eis gegossen und mit fester Citronensäure bis auf pH 4 angesäuert. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase noch dreimal ausgeethert. Die vereinigten Etherphasen werden abwechselnd dreimal mit 10 %iger Na_2CO_3-Lösung und Wasser gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Ethers im Vakuum erhält man 27.8 gelbes Öl, das schnell kristallisiert.

Ausbeute: 25.6 g (85 %)

Fp.: 57-58° C, Lit.: 44-45° C[326)]

Rf_E: 0.60

$C_{17}H_{28}O$ (248.4) Ber: C 82.20 H 11.36

Gef: C 82.32 H 11.65

V.7.1.4. Fluorameisensäure-[1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methylethyl]ester (t-Bumeoc-F)

Zu 24.8 g (0.1 Mol) 2-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-2-propanol in 150 ml abs. Ether und 14 ml Triethylamin wird trockenes, SO_3-freies Carbonylchloridfluorid (hergestellt aus 120 g 65 %igem Oleum und 25 ml (0.45 Mol) Trichlorfluormethan (Frigen 11) nach Zitat[328,329]) bei -40° C direkt einkondensiert. Dabei fällt Triethylammoniumhydrochlorid aus. Nach Beendigung der Gasentwicklung läßt man das Gemisch auf 20° C erwärmen und leitet dann solange Stickstoff durch, bis der Geruch nach Fluorphosgen verschwunden ist. Das ausgefallene Hydrochlorid wird abgesaugt und mehrmals mit abs. Ether gewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum bei 10° C eingeengt. Man erhält ein schwach gelbes Öl, welches sich bei Raumtemperatur zersetzt. Es wird als etherische Lösung bei -18° C aufbewahrt.

Ausbeute: 20.2 g (71 %)

$C_{18}H_{27}O_2F$ (294.4)

V.7.1.5. Darstellung der t-Bumeoc-Aminosäuren (Allgemeine Arbeitsvorschrift

10 mMol der Aminosäure werden in 50 ml Dioxan/Wasser (1:1) gelöst oder suspendiert. Dann werden 3.5 g (12 mMol) t-Bumeoc-F in 10 ml abs. Dioxan unter Eiskühlung (0° C) bei konstantem pH-Wert (Autotitrator, 4N NaOH) zugetropft. Bei Bildung eines Niederschlags gibt man 5 ml Ether zur Reaktionslösung. Man läßt auf Raumtemperatur erwärmen und rührt noch einige Zeit bis zur Vervollständigung der Reaktion (DC-Kontrolle). Dann wird einmal mit Ether/PE (1:1) extrahiert, die organische Phase dreimal mit Wasser gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen bei 0° C mit EE überschichtet und mit 2N Citronensäure auf ca. pH 3.5 angesäuert. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase noch zweimal mit EE

extrahiert. Die vereinigten EE-Phasen werden mit Wasser neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der meist ölige Rückstand wird aus PE, Ether/PE oder EE/PE umkristallisiert.

V.7.2. Darstellung des Thymosin β_9 (1-7)

V.7.2.1. L-Asparaginsäure(ß-tert.-butylester) (H-L-Asp-(OBu^t)-OH)

32.7 g (79 mMol) Z-L-Asp(OBu^t)-ONb werden nach Zitat[310] in MeOH mit 10 % Pd/Aktivkohle hydriert.

Ausbeute: 12 g (89 %)

Fp.: 199° C (Zers.), Lit.: 189-190° C[311], 197° C (Zers.)[310]

Rf_A: 0.43, Rf_D: 0.27

$[\alpha]_D^{25}$: +8.2 (c=1.00,H_2O)

$[\alpha]_D^{25}$ Lit: +8.3 (c=1.00,H_2O)

$C_8H_{15}NO_4$ (189.2) Ber: C 50.87 H 7.99 N 7.40

Gef: C 51.08 H 8.14 N 7.47

V.7.2.2. N-[1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-N-hydroxysuccinimidester (t-Bumeoc-L-Asp(OBu^t)-OSu)

6.6 g (14.2 mMol) t-Bumeoc-L-Asp(OBu^t)-OH und 1.73 g (15.0 mMol) HOSu werden in 200 ml Ethylenglykoldimethylether gelöst und auf -20° C abgekühlt. Nach Zugabe von 3.22 g (15.0 mMol) DCCI in wenig Lösungsmittel läßt man auf Raumtemperatur erwärmen und rührt noch weitere 18 Stunden. Es wird abgekühlt, vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und im Vakuum eingeengt. Der ölige Rückstand kristallisiert nach kurzer Zeit durch. Nach Verreiben mit Ether wird abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 7.4 g (94 %)

Fp.: 142-146° C

Rf_D: 0.84

$[\alpha]_D^{20}$: -2.3 (c=1.01,DMF)

$C_{30}H_{44}N_2O_8$ (590.7) Ber: C 64.27 H 7.91 N 5.00

Gef: C 64.16 H 8.15 N 5.11

V.7.2.3. N-[1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.butyloxycarbonyl-L-lysin.Dicyclohexylammoniumsalz (t-Bumeoc-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-OH.DCHA)

3.45 g (14.1 mMol) H-L-Lys(Boc)-OH und 1.48 g (14.1 mMol) Na_2CO_3 werden in 80 ml Wasser klar gelöst. Nach Zugabe von 40 ml DMF wird auf 0° C abgekühlt und 7.9 g (14.1 mMol) t-Bumeoc-L-Asp(OBu^t)-OSu, gelöst in 80 ml DMF, zugetropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur rührt man noch 3 Stunden. Danach wird auf 2/3 eingeengt, mit 100 ml Wasser verdünnt und von Unlöslichem abfiltriert. Das Filtrat wird mit EE überschichtet und mit H_3PO_4 auf pH 4 angesäuert. Nach Abtrennen der EE-Phase wird noch einmal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden neutral gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der verbleibende Schaum wird in n-Hexan gelöst und mit 2.54 g (14.1 mMol) DCHA versetzt. Das Produkt kristallisiert im Kühlschrank.

Ausbeute: 8.7 g (90 %)

Fp.: 115-118° C

Rf_D: 0.62, Rf_H: 0.40

$[\alpha]_D^{18}$: +4.4 (c=1.01,MeOH)

$C_{49}H_{84}N_4O_9$ (873.2) Ber: C 67.40 H 9.70 N 6.42

Gef: C 66.53 H 9.74 N 6.33

V.7.2.4. N-[1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (t-Bumeoc-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe)

6 g (9.5 mMol) t-Bumeoc-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-OH (aus dem DCHA-Salz durch Verteilen zwischen EE/10 % Citronensäure), 5.04 g (9.5 mMol) H-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe.Acetat und 2.57 g (19 mMol) HOBt werden in 100 ml abs. DMF gelöst und nach Abkühlen auf -15° C mit 0.96 g (9.5 mMol) N-Methylmorpholin versetzt. Nach 5 Minuten gibt man 2.06 g (10 mMol) DCCI in wenig DMF gelöst zu und rührt nach Erreichen der Raumtemperatur noch 18 Stunden. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abgetrennt und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird in EE aufgenommen und basisch, sauer und schließlich neutral gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Es wird aus Ether/PE umgefällt.

Ausbeute: 8.4 g (78 %)

Fp.: 82-89° C

Rf_D: 0.60

$[\alpha]_D^{18}$: -47.0 (c=1.01, MeOH)

$C_{59}H_{97}N_7O_{15}$ (1144.5) Ber: C 61.92 H 8.54 N 8.57

Gef: C 61.03 H 8.30 N 8.67

Aminosäurenanalyse:	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly
Ber:	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Gef:	1.80	0.87	1.08	1.08	1.00

V.7.2.5. L-Asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (H-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe)

5 g (4.3 mMol) t-Bumeoc-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe werden zwei Minuten mit 3 % TFA/CH_2Cl_2 behandelt und anschließend mit 25 %iger Ammoniaklösung neutralisiert. Nach Einengen zur Trockene wird in EE aufgenommen, mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Der nach Filtration und Eindampfen verbleibende Rückstand ist chromatographisch einheitlich, konnte aber nicht kristallisiert werden.

Ausbeute: 3.6 g (98 %)

Fp.: 52-58° C

Rf_D: 0.44, Rf_H: 0.14

$[\alpha]_D^{24}$: -49.7 (c=1.00,MeOH)

$C_{41}H_{71}N_7O_{13}$ (870.1) Ber: C 56.60 H 8.23 N 11.27

Gef: C 56.20 H 8.16 N 10.99

V.7.2.6. Acetyl-L-alanyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-N^{ε}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-prolyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-leucyl-glycinmethylester (Ac-L-Ala-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe)

3 g (3.4 mMol) H-L-Asp(OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Pro-L-Asp(OBu^t)-L-Leu-Gly-OMe werden in 150 ml abs. Methylenchlorid gelöst. Nach Abkühlen auf 0° C gibt man 844 mg (3.7 mMol) Ac-L-Ala-OSu und 374 mg (3.7 mMol) Triethylamin zu. Nach 6stündigem Rühren wird zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in EE aufgenommen, wie üblich alkalisch und sauer gewaschen und getrocknet. Es wird aus EE/Ether umkristallisiert.

Ausbeute: 2.6 g (79 %)

Fp.: 129-132° C

Rf_D: 0.68

$[\alpha]_D^{25}$: -74.1 (c=1.01,MeOH)

$C_{46}H_{78}N_8O_{15}$ (983.2) Ber: C 56.20 H 8.00 N 11.40

Gef: C 55.93 H 7.98 N 11.31

Aminosäurenanalyse:	Ala	Asp	Lys	Pro	Leu	Gly
Ber:	1.00	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Gef:	1.01	1.92	1.01	0.96	1.00	0.99

Racemattest:	%D-Ala	%D-Asp	%D-Lys	%D-Pro	%D-Leu
	3.8	7.1	1.9	1.4	2.2

V.7.2.7. Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung der Abspaltungskinetik

60 µMol der geschützten Aminosäure werden mit 1 ml Abspaltungsreagenz bei Raumtemperatur versetzt und stark gerührt. Nach bestimmten Zeitabständen (15, 30, 45 sec. usw.) werden jeweils 20 µl entnommen,und die Reaktion wird durch Einbringen in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß gestoppt (Meßzeit). Dieses enthält 200 µl MeOH und je nach Abspaltungsmedium 50-100 µl 5 %ige NH_3-Lösung (die Menge wurde durch eine Blindprobe für jedes Reagenz vorher bestimmt; der pH-Wert sollte nach dem Abstoppen bei ca. 8 liegen). Die Lösung wird im Exsiccator über Phosphorpentoxid eingedampft und dann in 40 µl bzw. 200 µl MeOH/0.01 M NH_4Ac (8:2) gelöst. Nun werden 2 µl von jeder Probe auf eine DC-Platte getüpfelt und im System $CHCl_3$/MeOH/C_6H_6/H_2O (40:40:40:5) chromatographiert, oder es werden 10 µl bei den HPLC-Untersuchungen direkt injiziert. Die Detektion bei der dünnschichtchromatographischen

Untersuchung erfolgte nach dem Trocknen durch Besprühen mit Ninhydrin-Lösung und 5 min. Entwickeln im Trockenschrank bei 120° C.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene Synthesewege von Thymosin β_9 (1-7) werden beschrieben. Zu der Charakterisierung der Zwischenverbindungen werden vorwiegend die ^{13}C-NMR-Spektroskopie und die Felddesorptions-Massenspektrometrie herangezogen.

Beim ersten Syntheseweg wird das Thymosin β_9 (1-7) mit geschützter Carboxylgruppe synthetisiert. Vom Glycinmethylester ausgehend wird vom Carboxylende her das Fragment 4-7 (H-Pro-Asp(OBu^t)-Leu-Gly-OMe) schrittweise aufgebaut. Anschließend wird das Fragment 2-3 (Z-Asp(OBu^t)-Lys(Boc)-OH) in einer DCCI/HOBt-Kupplung mit Fragment 4-7 zum geschützten Hexapeptid umgesetzt. Nach Entfernung der Z-Gruppe wird mit Ac-Ala-OH zum geschützten Thymosin β_9 (1-7) verlängert. Dieses kann nach der Azidmethode an das Fragment 8-41 gekuppelt werden.

Da die Verseifung des Methylesters in Anwesenheit eines Asparaginsäure-ß-tert.-butylesters immer zu Nebenprodukten führt, muß das Peptid mit freier Carboxylgruppe vollkommen neu synthetisiert werden. Zur Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren und Fragmente wird hauptsächlich die DCCI/HOSu-Methode verwendet. Das so erhaltene Thymosin β_9 (1-7) kann nun z.B. mit DCCI/HOBt an das Fragment 8-41 gekuppelt werden.

Bei der dritten Strategie wird auf der Stufe des Hexapeptids die neue 1-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl(t-Bumeoc)-Gruppe eingesetzt, da die Hydrierung an dieser Stelle unter Bildung von Nebenprodukten verläuft. Sie wurde mit der Absicht entwickelt, eine ausreichend große Selektivität neben anderen säurelabilen Schutzgruppen zu erreichen. Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Dünnschichtchromatographie wird ihr Abspaltungsverhalten unter sauren Bedingungen untersucht. Die Abspaltungszeiten und Geschwindigkeitskonstanten der nach einer Reaktion 1. Ordnung ablaufenden Abspaltungsreaktion von ver-

schiedenen t-Bumeoc-Aminosäuren in den drei Systemen 3 % Trifluoressigsäure in Methylenchlorid, 80 %ige Essigsäure und Essigsäure/83 Gew.-% Ameisensäure/Wasser (7:1:2) werden angegeben. Die synthetisierten t-Bumeoc-Aminosäuren werden durch ^{13}C-NMR-Spektren und Elementaranalyse, Drehwert, Schmelzpunkt und Rf-Wert charakterisiert. An der Teilsequenz Thymosin β_9 (2-7) wird die Eignung als Aminoschutzgruppe bei der Synthese größerer Peptide demonstriert. Dabei zeigt sich, daß der t-Bumeoc-Rest bei den üblichen Kupplungsmethoden vollkommen stabil bleibt. Die saure Abspaltung neben tert.-Butylestern, tert.-Butylethern und der N^{ε}-Boc-Gruppe gelingt mit sehr guter Selektivität. Die Deblockierung verläuft im Vergleich zur N^{α}-Boc-Gruppe 4000-8000 mal schneller. Der ausgeprägte lipophile Charakter des t-Bumeoc-Restes führt bei Aminosäuren und Peptiden zu einer sehr starken Löslichkeitsverbesserung in organischen Lösungsmitteln.

Das mit t-Bumeoc geschützte Hexapeptid Thymosin β_9 (2-7) wird durch zweiminütiges Behandeln mit 3 % Trifluoressigsäure in Methylenchlorid ohne Bildung von Nebenprodukten deblockiert. Die anschließende Kettenverlängerung ergibt ein zu Syntheseweg 1 identisches Produkt. Die t-Bumeoc-Gruppe kann somit vorteilhaft als sehr säurelabile, lösungsvermittelnde und neben anderen acidolytisch abspaltbaren Resten selektiv deblockierbare Aminoschutzgruppe eingesetzt werden.

Das freie Peptid erhält man durch einfaches Behandeln mit Trifluoressigsäure. Falls notwendig, wird vorher mit 1N NaOH verseift. Die Feinreinigung erfolgt durch Gelchromatographie an G 15 und Verteilungschromatographie an Kieselgel. Die Reinheit wird durch Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Fließmittelsystemen kontrolliert.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. D. Osoba und J.F.A.P. Miller, Nature 199, 653 (1963)
2. A.L. Goldstein, F.D. Slater und A. White, Proc. Natl. Acad. Sci. 56, 1010 (1966)
3. D. Osoba, J. Exp. Med. 122, 633 (1965)
4. J.F.A.P. Miller, Lancet 2, 748 (1961)
5. O.K. Archer und J.C. Pierce, Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. 20, 26 (1961)
6. J.F.A.P. Miller, Proc. Roy. Soc. B 156, 415 (1962)
7. J.F.A.P. Miller, Ann. N.Y. Acad. Sci. 99, 340 (1962)
8. A.P. Dalmasso, C. Martinez und R.A. Good, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 205 (1962)
9. R.A. Good, A.P. Dalmasso, C. Martinez, O.K. Archer, J.C. Pierce and B.W. Papermaster, J. Exp. Med. 116, 773 (1962)
10. R.A. Good und B.W. Papermaster, Adv.Immunol. 4, 1 (1964)
11. B.G. Aronson, B.D. Janovic und B.H. Waksman, Nature 194, 99 (1962)
12. J.F.A.P. Miller, A.H.E. Marshall und R.G. White, Adv. Immunol. 2, 111 (1962)
13. J.F.A.P. Miller und D. Osoba, Physiol. Rev. 47, 437 (1967)
14. J.F.A.P. Miller, Science 144, 1544 (1964)
15. N.B. Everett und R.W. Tyler, Int. Rev. Cytol. 22, 205 (1967)
16. E.S. Golub, Die Immunantwort, Springer-Verlag, Berlin, 1982
17. R. Keller, Immunologie und Immunophysiologie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1981
18. A.M. Gross, E. Leuchars und J.F.A.P. Miller, J. Exp. Med. 119, 837 (1964)
19. J.F.A.P. Miller, M.A. Doak und A.M. Cross, Proc. Soc. Exp. Med. 112, 785 (1963)
20. A.L. Goldstein, T.L.K. Low, M.M. Zatz, N.R. Hall und P.H. Naylor, Clin. Immunol. Allergy 3, 119 (1983)
21. G.S. Incefy, Clin. Immunol. Allergy 3, 95 (1983)
22. R.N. Levey, N. Trainin und L.E. Law, J. Natl. Cancer Inst. 31, 199 (1963)
23. D. Osoba und J.F.A.P. Miller, J. Exp. Med. 119, 177 (1964)
24. C.A.M. Trench, S.W. Watson, F.C. Walker, R.S. Gardner und C.A. Green, Immunol. 10, 187 (1966)
25. J.F.A.P. Miller und G.F. Mitchell, J. Exp. Med. 128, 821 (1968)

26. O. Stutman, E. Yunis und R.A. Good, J. Exp. Med. 132, 583 (1970)

27. M. Dardenne, M. Papiernik, J.F. Bach und O. Stutman, Immunol. 27, 299 (1974)

28. A.P. Dalmasso, C. Martinez, K. Sjodih und R.A. Good, J. Exp. Med. 118, 1089 (1963)

29. N. Trainin und M. Linker-Israeli, Cancer Res. 27, 309 (1967)

30. L.W. Law, N. Trainin, R.H. Levey und W.F. Barth, Science 143, 1049 (1964)

31. H.N. Caman, E.A. Chaperon und R.F. Triplett, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122, 1167 (1966)

32. A.P. Dalmasso, C. Martinez und R.A. Good, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 205 (1962)

33. N. Trainin, Physiol. Rev. 54, 272 (1974)

34. N.L. Warner, A. Szenberg und F.M. Burnet, Austr. J. Exp. Biol. 40, 373 (1962)

35. B.W. Papermaster, D.I. Friedmann und R.A. Good, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 62 (1962)

36. Z.A. Cohn, Adv. Immunol. 9, 169 (1968)

37. G.J.V. Nossal, Ann. Rev. Med. 18, 81 (1967)

38. J.F.A.P. Miller, G.F. Mitchell, Proc. Natl. Acad. Sci. 59, 296 (1968)

39. M. Feldmann, A. Rosenthal und P. Erb, Int. Rev. Cytol. 60, 149 (1979)

40. E.R. Unanue, Adv. Immunol. 15, 95 (1972)

41. P.E. Lipsky und A.S. Rosenthal, J. Exp. Med. 141, 138 (1975)

42. D.E. Mosier, J. Exp. Med. 129, 351 (1969)

43. D.D. Wood, J. Immunol. 123, 2395 (1979)

44. E.M. Hersh und J.E. Harris, J. Immunol. 100, 1184 (1968)

45. P. Erb und M. Feldmann, Eur. J. Immunol. 5, 759 (1976)

46. H.G. Opitz, H. Lemke und G. Hewlett, Immunol. Rev. 40, 59 (1978)

47. I. Gery, R.K. Gershon und B.H. Waksman, J. Exp. Med. 136, 128 (1972)

48. D.L. Rosenstreich und S.B. Mizel, Immunol. Rev. 40, 102 (1978)

49. G.J.V. Nossal und O. Mäkela, J. Immunol. 88, 604 (1962)

50. O. Stutman, Ann. N.Y. Acad. Sci. 249, 89 (1975)

51. H.N. Claman und E.A. Chaperon, Transplant. Rev. 1, 92 (1969)

52. D.E. Mosier, Science 158, 1573 (1967)

53. P. Erb und M. Feldmann, Cell. Immunol. 19, 356 (1975)

54. L. Chess und S.F. Schlossman, Adv. Immunol. 25, 213 (1977)

55. A.D. Mo, D.D.F.Ma, G. Price, W. Hunstein und A.V. Hoffbrand, Immunol. 50, 471 (1983)

56. O. Stutman, Clin. Immunol. Allergy 3, 9 (1983)

57. M.A. Vadas, J.F.A.P. Miller, J.F.C. McKenzie, S.M. Chism, F.W. Shen, E.A. Boyse, J.R. Gamble und A.M. Whitelaw, J. Exp. Med. 144, 10 (1976)

58. H. Cantor, F.W. Shen und E.A. Boyse, J. Exp. Med. 143, 1391 (1976)

59. G.J.V. Nossal, B.L. Pike, J.W. Stocker, J.E. Layton und J.W. Goding, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 237 (1976)

60. G. Brown und M.F. Greaves, Eur. J. Immunol. 4, 235 (1974)

61. A. Basten, R. Ioblay, E. Chia, R. Callard und H. Pritchard-Briscoe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 93 (1976)

62. R.R.A. Coombs und D. Franks, Progr. Allergy 13, 174 (1969)

63. D.H. Katz und B. Benacerraf, Adv. Immunol. 15, 1 (1972)

64. J.H.L. Playfair, Clin. Exp. Immunol. 8, 839 (1971)

65. G.W. Siskind und B. Benacerraf, Adv. Immunol. 10, 1 (1969)

66. B. Kindred und D.C. Schreffler, J. Immunol. 109, 940 (1972)

67. J.F.A.P. Miller und G.F. Mitchell, Transplant. Rev. 1, 3 (1969)

68. A. Schimpl und E. Wecker, J. Exp. Med. 137, 547 (1973)

69. H. Wagner, J. Exp. Med. 138, 1379 (1974)

70. M.D. Cooper, R.D.A. Peterson und R.A. Good, Nature 205, 143 (1965)

71. P.J. Baker, Transplant. Rev. 26, 3 (1975)

72. R.W. Dutton, Transplant. Rev. 26, 39 (1975)

73. B.F. Haynes und A.S. Fauci, J. Immunol. 118, 2281 (1977)

74. T. Tada, M. Taniguchi und T. Takemori, Transplant. Rev. 26, 107 (1975)

75. D.L. Pary und C.W. Pierce, J. Exp. Med. 140, 356 (1974)

76. R.K. Gershon und K. Kondo, Immunol. 21, 303 (1971)

77. H. Cantor und Asofsky, J. Exp. Med. 131, 225 (1970)

78. W.W. Bullock, D.H. Katz und B. Benacerraf, J. Exp. Med. 142, 275 (1976)

79. S.S. Rich und R.R. Rich, J. Exp.Med.142, 1391 (1976)

80. H. Wagner, J. Exp. Med. 138, 1523 (1974)

81. H. Cantor und E.A. Boyse, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 23 (1976)

82. B. Huber, O. Devinsky, R.K. Gershon und H. Cantor, J. Exp. Med. 143, 1534 (1976)

83. C.A. Janeway, S.O. Shanow und E. Simpson, Nature 253, 544 (1975)

84. L.A. Herzenberg, K. Okumura, H. Cantor, V.L. Sato, F.W. Shen, E.A. Boyse und L.A. Herzenberg, J. Exp. Med. 144, 330 (1976)

85. J.F. Bach, M. Dardenne und M.A. Bach, Transplant. Proc. 5, 523 (1973)

86. L.H. Block, H. Jaschke, S. Bamberger und G. Ruhenstroth-Bauer, J. Exp. Med. 147, 541 (1978)

87. A. Schimpl und E. Wecker, Nature New Biol. 237, 15 (1972)

88. T. Tada und K. Okumura, Adv. Immunol. 28, 1 (1979)

89. D.H. Katz, M.E. Dorf und B. Benacerraf, J. Exp. Med. 140, 290 (1974)

90. J.M.D. Plate, Nature 260, 329 (1976)

91. H. Cantor und E.A. Boyse, J. Exp. Med. 141, 1370 (1975)

92. H. Cantor und E.A. Boyse, J. Exp. Med. 141, 1390 (1975)

93. J.M. Dwyer, Progr. Allergy 21, 178 (1976)

94. I. Roitt: Immunologie, Steinkopff-Verlag, Darmstadt 1977

95. F.P. Siegal, M. Siegal und R.A. Good, J. Clin. Invest. 58, 109 (1976)

96. H.C. Thomas, M. Freni, J. Sanchez-Tapias, D. DeVilliers, S. Jain und S. Sherlock, Clin. Exp. Immunol. 26, 222 (1976)

97. B.C. Broom, E.G. de la Concha, A.D.B. Webster, G.J. Janossy und G.L. Asheron, Clin. Exp. Immunol. 23, 73 (1976)

98. D.W. Wara und A.J. Ammann, Pediatrics 57, 643 (1976)

99. M.A. DiGeorge, Birth Defects 4, 116 (1968)

100. W.M.L. Epstein, H.H. Fudenberg, W.B. Reed, E. Boder und R.P. Sedgwick, Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol. 30, 15 (1966)

101. F.D. Lindström, W.R. Hardy, B.J. Eberle und R.C. Williams, Ann. Int. Med. 78, 837 (1973)

102. H. Mellstedt und G. Holm, Clin. Exp. Immunol. 15, 309 (1973)

103. S.A. Hillinger und G.P. Herzig, J. Clin. Invest. 61, 1620 (1978)

104. J.J. Twomey, A.H. Laughter, S. Farrow und C.C. Deublass, J. Clin. Invest. 56, 467 (1975)

105. H.N. Claman, S.D. Miller und J.W- Moorhead, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 105 (1976)

106. E. Kölsch, R. Stumpf und G. Weber, Transplant. Rev. 26, 56 (1975)

107. J. Lindström, Adv. Immunol. 27, 1 (1979)

108. H. Geld, W.R. van Der und A.J.L. Strauss, Lancet 1, 57 (1966)

109. H.C. Thomas, M. Freni, J. Sanchez-Tapias, D. DeVilliers, S. Janin und S. Sherlock, Clin. Exp. Immunol. 26, 222 (1976)

110. S. Horowitz, W. Borcherding, A.V. Moorthy, R. Chesney, H. Schulte-Wissermann, R. Hong und A.L. Goldstein, Science 197, 999 (1977)

111. J.F. Bach und C. Carnaud, Progr. Allergy 21, 342 (1976)

112. R. Zaizov, R. Vogel, I. Varsano, J. Cohen, B. Shoat, V. Rotter und N. Trainin, Biomed. 27, 105 (1977)

113. M.A. Hardy, M. Zisblatt, N. Levine, A.L. Goldstein, F. Lilly und A. White, Transplant. Proc. 3, 926 (1971)

114. M. Zisblatt, A.L. Goldstein, F. Lilly und A. White, Proc. Natl. Acad. Sci. 66, 1170 (1970)

115. F. Bistoni, P. Marconi, L. Frati, E. Bonmassar und E. Garaci, Infect. Immunity 36, 609 (1982)

116. F. Fiorilli, M.C. Siriani, F. Pandolfi, J. Quinti, U. Toshi, F. Aiuti und G. Goldstein, Clin. Exp. Immunol. 45, 344 (1981),

117. M. Fiorilli, M.C. Siriani, F. Pandolfi, L.P. Pucillo, T. Letta und F. Aiuti, Thymus 4, 1 (1982)

118. M.F. Martelli, A. Velardi, P. Rambotti, C. Cernetti, A.M. Bracaglia, E. Ballatori und S. Davis, Cancer 49, 245 (1982)

119. P. Bordigoni, M.C. Bene, J.F. Bach, G. Faure, M. Dardenne, J. Duheille und D. Olive, Lancet 2, 293 (1982)

120. E.G. Paris und R.J. Levinsky, Pediatric Res. 16, 573 (1982)

121. E.G. Paris, R.J. Levinsky, D.R. Webster, H.A. Simmonds und D. Perrets, Clin. Exp. Immunol. 50, 303 (1982)

122. F. Aiuti, P. Ammirati, M. Fiorilli, R. D'Amelio, I. Franchi, M. Calvani und L. Businco, Pediatric Res. 13, 797 (1979)

123. T. Iwata, G.S. Infecy, S. Cunningham-Rundles, Ch. Cunningham-Rundles, E. Smithwick, N. Geller, R. O'Reilly und R.A. Good, Amer. J. Med. 71, 385 (1981)

124. L.H. Calabrese, J.F. Bach, T. Currie, D. Vidt, J. Clough und R.S. Krakauer, Arch. Int. Med. 141, 253 (1981)

125. D. Cupissol, A. Reg, A.L. Goldstein und B. Serron, J. Natl. Cancer Inst. 69, 27 (1982)

126. A.S. Klein und J. Shoham, Cancer Res. 41, 3217 (1981)

127. S.D. Lipsoh, P.B. Chretien, R. Makuch, P.E. Kenady und M.H. Cohen, Cancer 43, 863 (1979)

128. H. Sakai, J.J. Constanzi, F. Lonkas, R.G. Gagliano, S.E. Ritzmann und A.L. Goldstein, Cancer 36, 974 (1975)

129. L.A. Schafer, A.L. Goldstein, J.U. Guttermann und E.M. Hersh, Ann. N.Y. Acad. Sci. 277, 609 (1976)

130. J.J. Constanzi, G. Gagliano, F. Delaney, N. Harris, G.B. Thurmann, H. Sakai, A.L. Goldstein, D. Loukas, G. Cohen und P.D. Thomson, Cancer 40, 14 (1977)

131. C. Potrin, J.L. Tarpley und P.B. Chretien, Clin. Immunol. Immunopathol. 3, 476 (1975)

132. D.E. Kenady, P.B. Chretien, C. Potvin und R.M. Simon, Cancer 39, 575 (1977)

133. T.L.K. Low, G.B. Thurman, C. Chincarini, J.E. McClure, G.D. Marshall, S.K.Hu und A.L. Goldstein, Ann. N.Y. Acad. Sci. 332, 34 (1979)

134. J.A. Hooper, M.C. McDaniel, G.B. Thurman, G.H. Cohen, R.S. Schulof und A.L. Goldstein, Ann. N.Y. Acad. Sci. 249, 125 (1975)

135. N. Trainin und M. Small, J. Exp. Med. 132, 885 (1970)

136. T.L.K. Low und A.L. Goldstein in: The Year in Hematology (R. Silber, J.Lo Bue und A.S. Gordon, Eds.), S. 281, Plenum Pub., New York, 1978

137. A.L. Goldstein, A. Guha, M.L. Howe und A. White, J. Immunol. 106, 773 (1971)

138. F. Aiuti, V. Schirrmacher, P. Ammirati und F. Fiorilli, Clin. Exp. Immunol. 20, 499 (1975)

139. J.F. Bach, M. Dardenne, A.L. Goldstein, A. Guha und A. White, Proc. Natl. Acad. Sci. 68, 2734 (1971)

140. P.M. Scheid, M.K. Hoffmann, K. Komuro, N. Hammerling, E.A. Boyse, G.H. Cohen, J.A. Hooper, R.S. Schulof und A.L. Goldstein, J. Exp. Med. 138, 1027 (1973)

141. G.H. Cohen, J.A. Hooper und A.L. Goldstein, Ann. N.Y. Acad. Sci. 249, 145 (1975)

142. D. Wara, D.J. Barrett, A.J. Ammann und M.J. Cowan, Ann. N.Y. Acad. Sci. 332, 128 (1979)

143. P.H. Naylor, H. Sheppard, G.B. Thurman und A.L. Goldstein, Biochem. Biophys. Res. Comm. 73, 843 (1976)

144. G.B. Thurman, A. Ahmed, D.M. Strong, M.E. Gershwin, A.D. Steinberg und A.L. Goldstein, Transplant. Proc. 7, 299 (1975)

145. I. Goldschneider, A. Ahmed, F.J. Bollum und A.L. Goldstein, Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 2469 (1981)

146. N.H. Pazmino, J.N. Ihle und A.L. Goldstein, J. Exp. Med. 147, 708 (1978)

147. D.L. Healy, G.D. Hodgen, H.M. Schulte, G.P. Chrousos, D.L. Loriaux, N.R. Hall und A.L. Goldstein, Science 222, 1353 (1983)

148. D. Wara und A.J. Ammann, Transplant. Proc. 10, 203 (1978)

149. P.B. Chretien, S.D. Lipson, R.W. Makuch, D.E. Kenady und M.H. Cohen, Ann. N.Y. Acad. Sci. 332, 135 (1979)

150. A.L. Goldstein, A. Guha, M.M. Zatz, M. Hardy und A. White, Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 1800 (1972)

151. A.L. Goldstein, T.L.K. Low, M. McAdoo, J. McClure, G.B. Thurman, J.L. Rossio, C.Y. Lai, D. Chang, S.S. Wang, C. Harvey, A.H. Ramel und J. Meienhofer, Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 725 (1977)

152. J. Michalewsky, T.F. Gabriel, D.P. Winter, R. Makofske, W. Danho, J. Shirely, K. Biemann und J. Meienhofer, Int. J. Pept. Protein Res. 21, 93 (1983)

153. C. Birr, U. Stollenwerk, O. Brodner und H.G. Manke, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1129 (1979)

154. C. Birr und U. Stollenwerk, Angew. Chem. 91, 422 (1979)

155. T.W. Wong und R.B. Merrifield, Biochem. 19, 3233 (1980)

156. S.S. Wang, I.D. Kulesha und D.P. Winter, J. Amer. Chem. Soc. 101, 253 (1979)

157. S.S. Wang, R. Makofenske, A.E. Bach und R.B. Merrifield, Int. J. Pept. Protein Res. 15, 1 (1980)

158. T. Abiko, I. Onodera und H. Sekino, Chem. Pharm. Bull. 28, 3542 (1980)

159. J. Rey-Campos, M. Rey-Mendez und M. Freire, Int. J. Biochem. 15, 155 (1983)

160. C. Birr, U. Stollenwerk, O. Brodner und H.G. Manke in: Structure and Activity of Natural Peptites (W. Voelter, G. Weizel, Eds.), S. 337, Walter de Gruyter, Berlin 1981

161. M. Freire, O. Crivellaro, C. Insaacs und B.L. Horecker, Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 6007 (1979)

162. M. Mokotoff und A. Patchornik, Int. J. Pept. Protein Res. 21, 145 (1983)

163. M.G. Mutchnick, D.F. Keren, F.E. Weller, J.E. McClure und A.L. Goldstein, J. Immunol. Methods 60, 53 (1983)

164. H. Ishitsuka, Y. Umeda, A. Sakamoto und Y. Yagi, Adv. Exp. Med. Biol. 166, 89 (1983)

165. A. Ahmed, D.M. Wong, G.B. Thurmann, T.L.K. Low, A.L. Goldstein, S.S. Sharkis und I. Goldschneider, Ann. N. Y. Acad. Sci. 332, 81 (1979)

166. T.L.K. Low, G.B. Thurmann, M. McAdoo, J. McClure, J.L. Rossio, P.H. Naylor und A.L. Goldstein, J. Biol. Chem. 254, 981 (1979)

167. T.L.K. Low und A.L. Goldstein, J. Biol. Chem. 254, 987 (1979)

168. D.H. Schlesinger, G. Goldstein und H.D. Niall, Biochem. 14, 2214 (1975)

169. T.L.K. Low, S.K. Hu und A.L. Goldstein, Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 1162 (1981)

170. E. Hannappel, S. Davoust und B.L. Horecker, Biochem. Biophys. Res. Comm. 104, 266 (1982)

171. E. Hannappel, G.J. Xu, J. Morgan, J. Hempstead und B. L. Horecker, Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 2172 (1982)

172. G.J. Goodall, J. Gregory, J.I. Morgan und B.L. Horecker, Arch. Biochem. Biophys. 221, 598 (1983)

173. S.S. Wang, B.S.H. Wang, J.K. Chang, T.L.K. Low und A.L. Goldstein, Int. J. Pept. Protein Res. 18, 413 (1981)

174. T.L.K. Low, S.S. Wang und A.L. Goldstein, Biochem. 22, 733 (1983)

175. K. Hirose, N. Sakura, Y. Uchidea, M. Niskijima und T. Hashimoto, Pept. Chem. 1982, 155

176. G.J. Xu, E. Hannappel, J. Morgan, J. Hempstead und B.L. Horecker, Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 4006 (1982)

177. A,W. Filipowicz und B.L. Horecker, Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 1811 (1983)

178. E. Hannappel, S. Davoust und B.L. Horecker, Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 1708 (1982)

179. B.L. Horecker, U.S. Pat. US 4,389,343 (1982), Chem. Abstr. 99, 100097 z (1983)

180. E. Hannappel, S. Davoust und B.L. Horecker, Protides Biol. Fluids 30, 739 (1983)

181. T. Abiko und H. Sekino, J. Appl. Biochem. 4, 449 (1982)

182. T. Abiko und H. Sekino, Chem. Pharm. Bull. 31, 1320 (1983)

183. S. Erickson-Viitanen, S. Ruggieri, P. Natalini und B.L. Horecker. Arch. Biochem. Biophys. 225, 407 (1983)

184. S. Ruggieri, S. Erickson-Viitanen und B.L. Horecker, Arch. Biochem. Biophys. 226, 388 (1983)

185. J.F. Bach, M. Dardenne und M.A. Bach, Transplant. Proc. 5, 523 (1973)

186. J.F. Bach und M. Dardenne, Immunol. 25, 353 (1973)

187. J.M. Pleau, M. Dardenne, J.Y. Blouquit und J.F. Bach, J. Biol. Chem. 252, 8045 (1977)

188. J.F. Bach, M. Dardenne, J.M. Pleau und J. Rosa, Nature 266, 55 (1977)

189. J.C. Monier, M. Dardenne, J.M. Pleau, D. Schmitt, P. Deschaux und J.F. Bach, Clin. Exp. Immunol. 42, 470 (1980)

190. M. Dardenne, J.M. Pleau, J.Y. Blouquit und J.F. Bach, Clin. Exp. Immunol. 42, 477 (1980)

191. D. Schmitt, J.C. Monier, M. Dardenne, J.M. Pleau und J.F. Bach, Thymus 4, 221 (1982)

192. W. Sarino, M. Dardenne und J.F. Bach, Clin. Exp. Immunol. 52, 7 (1983)

193. J.F. Bach, M. Dardenne, J.M. Pleau und M.A. Bach, Ann. N. Y. Acad. Sci. 249, 186 (1975)

194. M. Dardenne, J.M. Pleau, N.K. Man und J.F. Bach, J. Biol. Chem. 252, 8040 (1977)

195. G.S. Infecy, M. Dardenne, J.F. Bach und R.A. Good, Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. 38, 1212 (1979)

196. D.B. Kaufmann, Clin. Exp. Immunol. 39, 722 (1980)

197. V. Lewis, J.J. Twomey und G. Goldstein, Lancet 2, 471 (1977)

198. J. Martinez, D. Blanot, G. Auger, A. Sasaki und E.Bricas, Int. J. Pept. Protein Res. 16, 267 (1980)

199. E. Bricas, J. Martinez, D. Blanot, G. Auger, M. Dardenne, J.M. Pleau und J.F. Bach in: Peptides, Proc. 5th Amer. Pept. Symp. (M. Goodman und J. Meienhofer, Eds.), S. 564, J. Wiley and Sons, New York, 1977

200. Y.P. Wan und K. Folkers, Bioorg. Chem. 8, 35 (1979)

201. D. Blanot, J. Martinez, G. Auger und E. Bricas, Int. J. Pept. Protein Res. 14, 41 (1979)

202. D. Blanot, J. Martinez, A. Sasaki, G. Auger, E. Bricas, M. Dardenne und J.F. Bach in: Peptides, Proc. 5th Amer. Pept. Symp. (E. Gross und J. Meienhofer, Eds.), S. 551, Pierce Chemical Company, 1979

203. R.G. Strachan, W.J. Palaveda, S.J. Bergstrand, R.F. Nutt, F.W. Holly und D.F. Veber, J. Med. Chem. 22, 586 (1979)

204. T. Fukuda, C. Kitada und M. Fujino, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1978, 220

205. J. Gyotoku, A. Imaizumi, S. Terada und E. Kimoto, Int. J. Pept. Protein Res. 21, 135 (1983)

206. G. Tsukamoto, K. Iuchi, M. Nitta, T. Nose und Y. Okada, J. Protein Chem. 1, 305 (1982)

207. T. Abiko und H. Sekino, Chem. Pharm. Bull. 30, 4448 (1982)

208. D. Kaiserlian, P. Bardos und J.F. Bach, Cell. Immunol. 76, 232 (1983)

209. K. Ogha, G.S. Infecy, K.F. Fok, B.W. Erickson und R.A. Good, J. Immunol. Methods 57, 171 (1983)

210. N. Trainin, M. Small und A. Globerson, J. Exp. Med. 130. 765 (1969)

211. N. Trainin, A.I. Kook, T. Umiel und M. Albala, Ann. N.Y. Acad. Sci. 249, 349 (1975)

212. N. Trainin, V. Rotter, Y. Yakir und R. Leve, Ann. N. Y. Acad. Sci. 332, 9 (1979)

213. A.I. Kook, Y. Yakir und N. Trainin, Cell. Immunol. 19, 151 (1978)

214. V. Rotter und N. Trainin, Cell, Immunol. 16, 413 (1975)

215. A.I. Kook und N. Trainin, J. Exp. Med. 139, 193 (1974)

216. V. Rotter und N. Trainin, Israel J. Med. Sci. 13, 363 (1977)

217. T. Umiel und N. Trainin, Eur. J. Immunol. 5, 85 (1975)

218. A.I. Kook und N. Trainin, Cell, Immunol. 19, 151 (1975)

219. N. Trainin und M. Small, J. Exp. Med. 132, 885 (1970)

220. V. Rotter, A. Globerson, I. Nakamura und N. Trainin, J. Exp. Med. 138, 130 (1973)

221. Y. Yakir, A.I. Kook und N. Trainin, J. Exp. Med. 148, 71 (1978)

222. I. Varsano, T.M. Schonfeld, Y. Matoth, B. Shohat, T. Englander, V. Rotter und N. Trainin, Acta Paediatr. Scand. 66, 329 (1977)

223. A. Astaldi, G.C.B. Astaldi, P.T.A. Schellekens und V.P. Eijsvoogel, Nature 260, 713 (1976)

224. A. Astaldi, G.C.B. Astaldi, P. Wijermans, A. Faccnini, T. van Bemmel, C.J.M. Lempers, P.T.A. Schellekens und V.P. Eijsvoogel in: Polypeptide Hormones (R.F. Beers und E.G. Bassett, Eds.), S. 489, Raven Press, New York, 1980

225. P. Wijermans, G.C.B. Astaldi, A. Facchini, P.T.A. Schellekens und A. Astaldi, Biochem. Biophys. Res. Comm. 86, 88 (1979)

226. G.C.B. Astaldi, A. Astaldi, M. Groenewond, P. Wijermans, P.T.A. Schellekens und V.P. Eijsvoogel, Eur. J. Immunol. 7, 836 (1977)

227. A.M. Kruisbeek, G.C.B. Astaldi, M.J. Blankwater, I.J. Zijlstra, L.A. Levert und A. Astaldi, Cell. Immunol. 35, 145 (1978)

228. K. Folkers, N. Sakura, T. Kubiak und H. Stepien, Biochem. Biophys. Res. Comm. 97, 595 (1980)

229. K. Folkers, T. Kubiak, H. Stepien und N. Sakura, Biochem. Biophys. Res. Comm. 97, 601 (1980)

230. K. Folkers, H. Stepien, T. Kubiak, N. Sakura und S. Sakgami, Biochem. Biophys. Res. Comm. 98, 115 (1981)

231. G. Goldstein, Nature 247, 11 (1974)

232. R.S. Basch und G. Goldstein, Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 1474 (1974)

233. R.S. Basch und G. Goldstein, Ann. N.Y. Acad. Sci. 249, 290 (1975)

234. D.H. Schlesinger und G. Goldstein, Cell, 5, 361 (1975)

235. T. Audhya, D.H. Schlesinger und G. Goldstein, Biochem. 20, 6195 (1981)

236. A.C. Chu, G. Goldstein, J. Patterson, C. Berger, S. Takezaki und R. Edelson, Lancet 2, 766 (1982)

237. D.H. Schlesinger, G. Goldstein, M.P. Scheid und E.A. Boyse, Cell. 5, 367 (1975)

238. G. Goldstein, M.P. Scheid, E.A. Boyse, D.H. Schlesinger und J. van Wauwe, Science 204, 1309 (1979)

239. C.Y. Lau und G. Goldstein, J. Immunol. 124, 1861 (1980)

240. C.Y. Lau, J. Freestone und G. Goldstein, I. Immunol. 125, 1634 (1980)

241. M.E. Gershwin, W. Kruse und G. Goldstein, J. Rheumatol. 6, 610 (1979)

242. M.E. Weksler, J.B. Innes und G. Goldstein, J. Exp. Med. 148, 996 (1978)

243. M.P. Scheid, G. Goldstein und E.A. Boyse, J. Exp. Med. 147, 1727 (1978)

244. G. Goldstein und C.Y. Lau in: Polypeptide Hormones, S. 459 (siehe Lit. 224)

245. P.A. Thrower, A.D. Sedgwick, E.R. Smith, D.A. Willoughby und E.C. Huskisson, Ann. Rheum. Dis. 42, 94 (1983)

246. M. Fujino, S. Shinagaw, T. Fukuda, M. Takaoki, H. Kawaji und S. Sugino, Chem. Pharm. Bull. 25, 1486 (1977)

247. E.G. Bliznakov, Y. Wan, D. Chang und K. Folkers, Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 631 (1978)

248. T. Abiko und H. Sekino, Chem. Pharm. Bull. 30, 3271 (1982)

249. J.P. Tischio, J.E. Patrick, H.S. Weintraub, M. Chasin und G. Goldstein, Int. J. Pept. Protein Res. 14, 479 (1979)

250. F. Aiuti, P. Businco, P. Rossi und I. Quinti, Lancet 1, 91 (1980)

251. W. Heinzel und W. Voelter, Chemiker Zeitg. 105, 291 (1981)

252. H. Verhaegen, W. DeCock, J. DeCree und G. Goldstein, Thymus 1, 195 (1980)

253. W. Heinzel, Dissertation, Universität Tübingen, 1983

254. Ch. Friedel, Diplomarbeit, Universität Tübingen, 1984

255. G. Rampold, E. Lundanes, K. Folkers, W. Voelter, H. Kalbacher und E.G. Bliznakov, Z. Naturforsch. 358, 1476 (1980)

256. F.S. Tjoeng und G.A. Haevner, J. Labelled Compd. Radiopharm. 20, 179 (1983)

257. F.S. Tjoeng und G.A. Heavner, J. Org. Chem. 48, 355 (1983)

258. F.S. Tjoeng und G.A. Heavner, Tetrhedron Lett. 23, 4439 (1982)

259. P. Liu, H. Chen, X. Sun, T. Wang, Y. Yuan, Y. Zhao und S. Meng, Zhonghua Weishengwuxue He Miauyixue Zazki 3, 137 (1983), Chem. Abstr. 100, 45764b (1984)

260. M. Bodanszky, A.A. Ondetti, S.D. Levine und J. Williams J. Amer. Chem. Soc. 89, 6753 (1967)

261. M. Bodanszky und S. Natarajan, J. Org. Chem. 40, 2495 (1975)

262. M. Bodanszky und J.Z. Kwei, Int. J. Pept. Protein Res. 12, 69 (1978)

263. A.R. Battersby und J.C. Robinson, J. Chem. Soc. 1955, 259

264. K. Suzuki, K. Nitta und Y. Sasaki, Chem. Pharm. Bull. 24, 3025 (1976)

265. S.S. Wang, C.C. Yang, I.D. Kulesha, M. Sonnenberg und R.B. Merriefield, Int. J. Pept. Protein Res. 6, 103 (1974)

266. G.W. Anderson und A.C. McGregor, J. Amer. Chem. Soc. 79, 6180 (1957)

267. R. Hirschmann und F.D. Veber in: The Chemistry of Polypeptides, Essays in Honor of Leonidas Zervas (G. Katsoyannis, Ed.), S. 125, Plenum Press, New York, 1973

268. M. Bergmann und L. Zervas, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 65, 1192 (1932)

269. J. Müller und W. Voelter, Liebigs Ann. Chem. 1983, 248

270. L.A. Carpino, J. Amer. Chem. Soc. 79, 98 (1957)

271. F.C. McKay und N.F. Albertson, J. Amer. Chem. Soc. 79, 4686 (1957)

272. G.W. Anderson und A.C. McGregor, J. Amer. Chem. Soc. 79, 6180 (1957)

273. R. Schwyzer und H. Kappeler, Helv. Chim. Acta 46, 1550 (1963)

274. W. König und R. Geiger, Chem. Ber. 103, 788 (1970)

275. Y.S. Klausner und M. Bodanszky, Synthesis 1972, 453

276. N.L. Benoiton, K. Kuroda und F.M.F. Chen, Int. J. Pept. Protein Res. 13, 403 (1979)

277. F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, Z. Naturforsch. 21 b, 426 (1966)

278. E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. 99, 110 (1966)

279. M. Goodman, P. Keogh und H. Anderson, Bioorg. Chem. 6, 239 (1977)

280. J. Honzl und J. Rudinger, Collect. Chem. Commun. 26, 2333 (1961)

281. H. Horn, Dissertation, Universität Tübingen, 1981

282. W. Voelter und A. Altenburg, Liebigs Ann. Chem. 1983, 1641

283. R. Schwyzer, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker, W. Rittel und H. Zaber, Helv. Chim. Acta 46, 1975 (1963)

284. S. Bajusz, T. Lázár und Z. Paulay, Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 41, 329 (1964)

285. H. Frank, W. Woiwode, G. Nicholson und E. Bayer, Liebiegs Ann. Chem. 1981, 354

286. C. Birr, W. Lochinger, G. Stahnke und P. Lang, Liebigs Ann. Chem. 763, 162 (1972)

287. P. Sieber und B. Iselin, Helv. Chim. Acta 51, 622 (1968)

288. H. Kalbacher und W. Voelter, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1161 (1979)

289. H. Kalbacher und W. Voelter, Angew. Chem. 90, 998 (1978)

290. H. Franzén und W. Ragnarson, Acta Chem. Scand. 35 B, 690 (1979)

291. A. Tun-Kyi und R. Schwyzer, Helv. Chim. Acta 59, 1642 (1976)

292. H. Kalbacher, Dissertation, Universität Tübingen, 1980

293. E. Breitmaier und W. Voelter, ^{13}C-NMR-Spectroscopy, 2. Aufl. Verlag Chemie, Weinheim 1978

294. E. Breitmaier und G. Bauer, ^{13}C-NMR-Spektroskopie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1977

295. W. Fuchs, H. Kalbacher und W. Voelter, Org. Magn. Reson. 17, 157 (1981)

296. M.H. Greenberg, S.D. Painter und D.A. Price, Neuropeptide 1, 309 (1981)

297. W. Voelter, J. Müller, Ch. Beni, W. Heinzel, H. Kalbacher, A. Morel und H. Wollmann in: Peptides, Proc. Eur. Pept. Symp. 17th 1982 (K. Bláha und P. Malôn, Eds.), S. 125, Walter de Gruyter, Berlin 1983

298. Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, Firmenschrift der Fa. Merck, Darmstadt 1970

299. L.A. Carpino, C.A. Giza und B.A. Carpino, J. Amer. Chem. Soc. 81, 955 (1957)

300. J.B. Greenstein und M. Winitz in: Chemistry of the Amino Acids, J. Wiley and Sons, New York 1961

301. A.F. Olechnowitz und G. Zimmermann, Angew. Chem. 67, 209 (1955)

302. T. Curtius und F. Goebel, J. Prakt. Chem. 37, 50 (1888)

303. M. Bergmann, L. Zervas und J.S. Fruton, J. Biol. Chem. 115, 593 (1936)

304. G. Losse und E. Demuth, Chem. Ber. 94, 1762 (1961)

305. H. Determann, O. Zipp und Th. Wieland, Liebigs Ann. Chem. 651, 172 (1962)

306. T. Matoba und T. Hata, Agr. Biol. Chem. 36, 1432 (1972)

307. E. Wünsch und A. Zwick, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 333, 108 (1963)

308. M. Bergmann und L. Zervas, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 65, 1192 (1932)

309. W.D. John und G.T. Young, J. Chem. Soc. 1954, 2870

310. E. Schröder und E. Klingler, Liebigs Ann. Chem. 673, 208 (1964)

311. R. Schwyzer und H. Dietrich, Helv. Chim. Acta 44, 2003 (1961)

312. W. Grassmann und E. Wünsch, Chem. Ber. 91, 462 (1958)

313. A. Berger, J. Kurtz und E. Katchalski, J. Amer. Chem. Soc. 79, 185 (1954)

314. B. Bezas und L. Zervas, J. Amer. Chem. Soc. 83, 719 (1961)

315. E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. 97, 3305 (1964)

316. L. Zervas und C. Hamaladis, J. Amer. Chem. Soc. 87, 99 (1965)

317. R. Schwyzer und W. Rittel, Helv. Chim. Acta 44, 159 (1961)

318. J.W. Scott, D. Parker und P.R. Parrish, Synth. Comm. 11, 303 (1981)

319. G.W. Anderson, J.E. Zimmermann und F.M. Callahan, J. Amer. Chem. Soc. 86, 1839 (1964)

320. E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. 99, 105 (1966)

321. J.P. Greenstein und M. Winitz in: Chemistry of the Amino Acids Bd. III, S. 1832, J. Wiley and Sons Inc., New York 1961

322. H. Yajima, N. Mizokami, Y. Okada und K. Kawasaki, Chem. Pharm. Bull. 17, 1958 (1969)

323. J. Geuze, C. Ruinard, P.E. Verkade und B.M. Wepster, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 75, 301 (1956)

324. M.S. Carpenter und W.M. Easter, J. Org. Chem. 19, 87 (1954)

325. M.G.J. Beets, W. Meerburg und H. van Essen, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 78, 570 (1959)

326. H.D. Scharf und F. Döhring, Chem. Ber. 100, 1761 (1967)

327. W. van Hartingsveldt, P.E. Verkade und B.M. Wepster, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 75, 349 (1956)

328. G. Siegmund, Angew. Chem. 85, 982 (1973)

329. L. Wackerle und I. Ugi, Synthesis 1975, 598

L E B E N S L A U F

Name:	Jürgen Müller
Geburtstag und -ort:	25.03.1955, Schwäbisch Gmünd, Ostalbkreis
Eltern:	Hermann Müller und Margot Müller geb. Schweyher
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulbesuch:	
1962 - 1966:	Klösterleschule in Schwäbisch Gmünd
1966 - 1974:	Scheffold-Gymnasium Schwäbisch Gmünd
15.06.1974:	Ablegung der Reifeprüfung
01.07.1974-30.09.1975:	Ableistung des Grundwehrdienstes in Münster/Westf.
Studium:	
WS 1975/1976:	Immatrikulation für Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
April 1978:	Abschluß des Vordiploms
Juni 1980:	Mündliche Diplomprüfung
Juli 1980 - Dezember 1980:	Diplomarbeit: Darstellung und Eigenschaften neuer, säurelabiler Urethanschutzgruppen für Peptidsynthesen am Organischen Institut der Universität Tübingen
SS 1981:	Immatrikulation für Pharmazie
April 1982:	Ablegung des 1. Staatsexamens
August 1983:	Ablegung des 2. Staatsexamens
15. August 1983:	Geburt unserer Tochter Isabella
Januar 1981 - Februar 1984:	Praktischer Teil der vorliegenden Arbeit: Synthesen von Thymosin β_9 (1-7) unter Verwendung konventioneller Schutzgruppen und der neu entwickelten t-Bumeoc-Gruppe unter Leitung von Professor Dr. W. Voelter in der Abteilung für Physikalische Biochemie am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Bayer, W. Braun, E. Breitmaier, G. Gauglitz, F. Gönnenwein, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, H. Krüger, D. Krug, U. Kunze, E. Lindner, I.P. Lorenz, H. Mauser, H. Meier. H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, A. Rieker, W. Rundel, V. Schurig, F.F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, H. Suhr, W. Voelter, W. Zeil und K.P. Zeller

Druck und Gesamtherstellung:
H. Hummel, Bismarckstr. 116/6
D-7410 Reutlingen, Tel. 07121/45377